

Untersuchungen über cAMP
als extrazelluläres Steuersignal
bei *Dictyostelium discoideum*

Angela Blaschke

Disbui. München
1988



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Untersuchungen über cAMP als extrazelluläres Steuersignal
bei Dictyostelium discoideum

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt von Angela Blaschke
aus München
November 1987

1. Berichterstatter: Prof. H. K. MacWilliams
2. Berichterstatter: Prof. C. N. David

Tag der mündlichen Prüfung: 17. 2. 1988

Inhaltsverzeichnis

I. Zusammenfassung

II. Einleitung

III. Ergebnisse

1. Kurze Charakterisierung der verwendeten Stämme
 - 1.1. Dauer der Preaggregations- und Aggregationsphase
 - 1.2. Postaggregative Differenzierung
 - 1.3. Fruchtkörperbildung
2. cAMP-Spiegel in Slugs
3. Aktivität der Adenylatcyclase
 - 3.1. basale Aktivität
 - 3.2. Aktivierung der Adenylatcyclase
4. Aktivität der cAMP-spezifischen Phosphodiesterase
 - 4.1. Entwicklungsregulierte Aktivität der Phosphodiesterase
 - 4.2. Phosphodiesterase-Aktivität in suspensionsgehungerten Zellen
 - 4.3. Phosphodiesterase-Aktivität in Slugzellen
5. cAMP-Bindung
 - 5.1. cAMP-Bindung während der Entwicklung
 - 5.2. Bindungscharakteristik aggregierender Zellen
 - 5.3. Charakterisierung der cAMP-Bindung in Slugzellen
 - 5.4. Einfluß der Cellulasebehandlung auf die cAMP-Bindung
 - 5.5. Bindungsaktivität nichtaggregierter Zellen
6. cAMP-gesteuerte Prozesse
 - 6.1. Verhalten in vivo
 - 6.1.1. Level der Discoidin I-m-RNA in Hs1 und Hs2
 - 6.1.2. Level an Discoidinprotein
 - 6.1.3. Vergleich der Frühentwicklung von Hs1 und Hs2
 - a. α -Mannosidase
 - b. Expression der frühen Gene I42 und M3
 - 6.1.4. Struktur der Discoidingene
 - 6.1.5. Expression später Gene in vivo
 - a. D11- und PL3-Expression
 - b. MUD1-Expresion
 - 6.2. Induktion später Gene in vitro
 - 6.2.1. Induktion später Gene in aggregationskompetenten Zellen
 - a. Induktion später Gene in suspensionsgehungerten Zellen
 - b. Induktion später Gene bei agar-gehungerten Zellen
 - 6.2.2. Induktion später Gene bei aggregierenden Zellen
 - 6.2.3. Zeitlicher Verlauf der Induzierbarkeit
 - 6.2.4. Stabilisierung prespore-spezifischer Genexpression in disaggregierten Slugzellen
 - a. Schütteln unter Bildung von Agglomeraten
 - b. Schütteln ohne Bildung von Agglomeraten

IV. Diskussion

V. Material und Methoden

1. Wachstum der Zellen
2. Differenzierung der Zellen
3. Enzymatische Bestimmungen
 - 3.1. cAMP-Bestimmung
 - 3.2. Adenylatcyclase-assay
 - 3.3. cAMP-relay
 - 3.4. cAMP-Bindungsassay
 - 3.5. Phosphodiesterase-assay
 - 3.6. α -Mannosidase-assay
4. RNA-Analysen
 - 4.1. Isolierung von RNA
 - 4.2. Auftrennung der RNA durch Gelelektrophorese
 - 4.3. Transfer der RNA-Moleküle (Northern blotting)
 - 4.4. Nicktranslation der cDNA-Proben
 - 4.5. Hybridisierung
 - 4.6. Waschen der hybridisierten Filter
 - 4.7. Autoradiographie
5. Gewinnung der cDNA-Klone
 - 5.1. Transformation der Bakterien
 - 5.2. Plasmidisolation
6. DNA-Analysen
 - 6.1. Isolierung genomischer *Dictyostelium*-DNA
 - 6.2. Restriktionsverdau
 - 6.3. DNA-Gelelektrophorese
 - 6.4. Southern Transfer
7. Proteinanalysen
 - 7.1. Aufbereitung der Zellproben für Protein-Gelelektrophorese
 - 7.2. Proteingelelektrophorese
 - 7.3. Westernblotting
8. Bestimmung der MUD1-Expression
9. Durchführung der Geninduktions- und Genstabilisierungs-experimente

VI. Literaturverzeichnis

Zusammenfassung

Die dieser Arbeit zugrundeliegende Hypothese bestand in der Annahme, cAMP sei ein wichtiges extrazelluläres Signal, das in *Dictyostelium discoideum* u.a. die Proportionen der einzelnen Zelltypen zueinander reguliert. Um diese Annahme zu testen, wurde mit zwei Stämmen, einer Zelltypproportionsmutante, Hs2, und dem entsprechenden Wildtyp, Hs1, gearbeitet.

Es konnte kein Nachweis für eine direkte Änderung des extrazellulären cAMP-Spiegels in der Mutante erbracht werden. Dazu wurden sowohl der Gesamt- (d.h. intra- und extrazelluläre) cAMP-Spiegel als auch die Aktivitäten der cAMP-synthetisierenden und -degradierenden Enzyme bestimmt.

Es konnte jedoch gezeigt werden, daß die Zahl der cAMP-spezifischen Rezeptoren an der Zelloberfläche der mutierten Zellen erhöht ist. Dies deutet auf eine gesteigerte Sensitivität bezüglich cAMP.

Im weiteren wurde das Expressionsmuster einiger durch cAMP regulierter Gene untersucht, und es konnte gezeigt werden, daß Discoidin I, dessen Transkription nachweislich durch cAMP reprimiert wird, in der Mutante nur in sehr reduziertem Ausmaß exprimiert wird. Ebenso werden einige prestalk- und prespore-spezifische Gene, deren Expression durch cAMP zeitlich beschleunigt werden kann, in der Mutante, im normalen Verlauf der Entwicklung, frühzeitig exprimiert.

Da bekannt ist, daß die Transkription einiger Gene durch cAMP induziert werden kann, wurden Induktionsexperimente mit Wildtyp und Mutante unternommen. Mutierte Zellen konnten dabei in allen getesteten Fällen mittels geringerer cAMP-Konzentrationen dazu induziert werden, prestalk- und prespore-spezifische Gene zu exprimieren. Aufgrund dieser Ergebnisse fand ich die These, Hs2 reagiere sensibler auf cAMP, bestätigt.

In anderen Experimenten, in denen versucht wurde prespore-Genexpression in disaggregierten Zellen mittels cAMP zu stabilisieren, konnte diese Annahme jedoch nicht bestätigt werden. Hs2-Zellen zeigten sich in diesen Fällen weniger sensitiv cAMP gegenüber.

Dieses läßt den Schluß zu, daß Induktion und Stabilisierung von Genexpression durch cAMP durch zwei unterschiedliche Mechanismen reguliert werden und Hs2-Zellen sensativer im ersten Fall, und weniger sensitiv im zweiten Fall reagieren.

Einleitung

Dictyostelium discoideum gehört zur Klasse der Acrasiomyceten (zelluläre Schleimpilze) und ist der einfachste multizelluläre Organismus. Seine Fruchtkörper bestehen aus nur zwei Zelltypen, Stielzellen und Sporenzellen. *Dictyostelium discoideum* wurde deshalb zum beliebten Untersuchungsobjekt, um Fragestellungen im Bereich Zelltyppdifferenzierung und Zelltypproportionierung anzugehen.

Dictyostelium discoideum zeigt einen Lebenszyklus, der aus zwei verschiedenen Phasen besteht. In einer Phase, der sogenannten Vermehrungsphase (vegetative Phase), sind *Dictyostelium*-zellen einzellige Amöben, die sich durch Phagozytose von Bakterien ernähren und sich durch einfache Zellteilung vermehren.

Die zweite Phase wird als sogenannte Differenzierungsphase bezeichnet und wird durch Nahrungsentzug eingeleitet (siehe Fig. 1). In dieser Phase wandern tausende von Amöben auf ein Zentrum zu und formen, unterstützt durch Ausbildung spezifischer Zellkontakte, ein multizelluläres Aggregat. Dieser Aggregathaufen kann unter bestimmten Bedingungen längliche Gestalt annehmen und sich mehrere Stunden lang als eine Einheit auf dem Substrat fortbewegen. Dieses Stadium bezeichnet man als Slugstadium. In diesem Zustand können bereits zwei Zelltypen unterschieden werden, die sog. Prästiel- (prestalk) und Präsporen (prespore)-Zellen. Sie sind immer in einem charakteristischen räumlichen Muster im Slug angeordnet. Die prestalk-Zellen sind in der anterioren, die prespore-Zellen in der posterioren Region zu finden. Beide Zelltypen sind durch eine scharfe Grenze voneinander getrennt. Verschiedene Umweltsignale führen zu einer Kulmination des Slugs, die mit großen morphogenetischen Bewegungen verbunden ist. Die prespore-Zellen schieben sich dabei an den prestalk-Zellen vorbei und erheben sich in die Höhe. Es erfolgt eine terminale Differenzierung der prespore-Zellen in Sporenzellen, und der prestalk-Zellen in Stielzellen. Das Endprodukt ist ein Fruchtkörper, bestehend aus einer Masse Sporen, die auf dem von den Stielzellen gebildeten Stiel ruht. Die Sporenzellen sind die Überdauerungsform von *Dictyostelium*zellen. Bietet die Umwelt günstige Bedingungen, wie z.B. Nahrungsangebot, keimen

sie aus und bilden die eingangs erwähnten Amöben. Der Lebenszyklus hat sich damit geschlossen. Die Stielzellen selbst sind tot und bestehen nur aus einer dicken Cellulosewand, die eine riesige Vakuole umgibt.

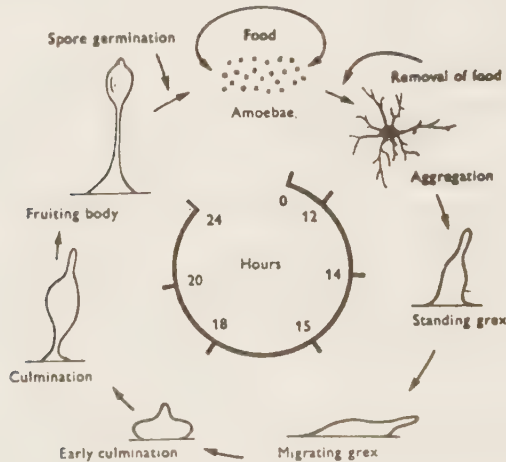


Fig. 1

Lebenszyklus des zellulären Schleimpilzes *Dictyostelium discoideum* (aus Garrod and Ashworth 1973).

Die Stundenangaben bezeichnen die Entwicklungsdauer auf Millipore-Filtern.

cAMP als Aggregationssignal

cAMP spielt eine zentrale Rolle im Lebenszyklus von *Dictyostelium discoideum*. Während der Aggregation ist cAMP das chemotaktisch wirksame Agens (Konijn et al 1967). Die Aggregation beginnt durch die spontane Produktion und Sekretion von cAMP einiger autonomer Zellen. Das ausgeschiedene cAMP bindet an cAMP-spezifische membran-gebundene Rezeptoren benachbarter Zellen, was im wesentlichen zwei Reaktionen zur Folge hat:

- a. die Zellen werden stimuliert selbst cAMP zu produzieren und nach außen abzugeben. Die Sekretion von cAMP als Antwort auf einen cAMP-Stimulus wird als "relay response" bezeichnet.
- b. die Zellen bewegen sich chemotaktisch auf die cAMP-Quelle zu.

Der Mechanismus der intrazellulären Weiterleitung des cAMP-Signals während der Aggregation ist im einzelnen sehr gut untersucht. Bindung von cAMP an die cAMP-spezifischen Rezeptoren führt zur Aktivierung einer Guanylatcyclase, und der intrazelluläre cGMP-Spiegel steigt innerhalb weniger Sekunden kurzzeitig an (Mato et al 1977, Wurster et al 1977). Dieser Anstieg steht sehr wahrscheinlich mit dem Ausführen der chemotaktischen Bewegung in Zusammenhang (Ross and Newell 1981, van Haastert et al 1982). Einige Sekunden später erfolgt eine Aktivierung der Adenylatcyclase, und der intrazelluläre cAMP-Spiegel steigt kurzfristig an (Shaffer 1975, Roos et al 1975, Dinauer et al 1980a). Das so produzierte cAMP wird nach außen abgegeben und stimuliert erneut, durch Bindung an die cAMP-spezifischen Rezeptoren, andere Zellen.

Nachdem die Zellen einen cAMP-Puls empfangen und entsprechend weiterverarbeitet haben, treten sie in eine refraktäre Periode, die ungefähr 6 min dauert, ein. In diesem Zeitraum können sie durch einen weiteren cAMP-Puls nicht stimuliert werden. Dieser Prozeß wird auch als Adaptation bezeichnet (Devreotes und Steck 1979, Dinauer et al 1980a,c). Das in vivo Signal während der Aggregation sind daher cAMP-Pulse mit einer Periodizität von etwa 6 min.

Durch Bindung von cAMP erfolgt eine Phosphorylierung des Rezeptors, der nach einigen Minuten wieder in den dephosphorylierten Zustand übergeht. Die phosphorylierten und dephosphorylierten Zustände des Rezeptors korrelieren jeweils mit dem durch cAMP stimulierbaren und adaptierten Zustand des Rezeptors, weshalb die Phosphorylierung des Rezeptors als biochemische Grundlage des Adaptationsprozesses angesehen wird (Klein et al 1985).

Zwischen zwei Pulsen wird das extrazelluläre cAMP durch eine eigene Phosphodiesterase (sowohl extrazellulär als auch membrangebunden) abgebaut. Das cAMP-Signalsystem kann nun



deadaptieren und danach erneut durch einen cAMP-Puls stimuliert werden. Wird von außen kontinuierlich cAMP zugegeben, führt dies zu einer Blockierung der Aggregation, da die Zellen nun nicht mehr deadaptieren können. Die Guanylat- und Adenylatcyclase können auf den Dauerstimulus nicht mit einer Aktivierung reagieren.

Zwischen dem Zeitpunkt des Nahrungsentzugs und dem Beginn der Aggregation vergehen mehrere Stunden. Dies wird als preaggregative Phase, oder auch als Interphase bezeichnet. In dieser Phase müssen verschiedene Komponenten, die für die Aggregation nötig sind, und die vegetative Zellen nicht besitzen, ausgebildet werden. Dazu gehören die cAMP-bildenden und -abbauenden Enzyme, Adenylatcyclase und Phosphodiesterase, die cAMP-spezifischen Rezeptoren in der Membran und die Contact-site-A-Moleküle, spezifische Zellkontakte, womit Zellen sich zu langen Strömen anordnen können. Zellen, die sämtliche Komponenten des cAMP-Signalsystems besitzen, jedoch noch nicht aggregiert haben, werden als aggregationskompetent bezeichnet.

cAMP als Regulator der Genaktivität

Eine weitere wichtige Rolle, die cAMP in der Entwicklung von *Dictyostelium discoideum* spielt, besteht in der Regulierung der Genaktivität. Es wurde gezeigt, daß durch Zugabe von externem cAMP sowohl pre- als auch postaggregative Genexpression induziert werden kann.

Preaggregative Gene

Zur Gruppe der preaggregativen Gene zählen mindestens drei Klassen von Genen, die sich in der Art und Weise, wie sie durch cAMP reguliert werden, unterscheiden. Eine Gruppe bilden die Gene M3 und I42 (Rowekamp and Firtel 1980). Beide werden bereits 2-3 Stunden nach Nahrungsentzug exprimiert, und maximale Expression erfolgt nach 5-7 Stunden. Danach sinkt die Expression sehr schnell ab, so daß nach Abschluß der Aggregation kaum noch M3/I42-Transkripte vorhanden sind. Externe Zugabe von cAMP-Pulsen (25 nM) alle 6 min führt zu

einer frühzeitigen und verstärkten Expression dieser Gene. Durch kontinuierliche Zugabe von cAMP, hoher oder niedriger Konzentration, wird die Expression dieser Gene vollständig reprimiert (Mann and Firtel 1987).

Auch die Aktivität der Adenylatcyclase (Klein and Darmon 1977), der membrangebundenen cAMP-spezifischen Phosphodiesterase (van Haastert et al 1981), die Bindungsaktivität der cAMP-spezifischen Rezeptoren (Juliani et al 1981, Klein and Giuliani 1977) und die Anzahl der Contact-site-A-Moleküle (Gerisch et al 1975) werden nur durch Pulse von cAMP stimuliert, nicht jedoch durch kontinuierliche cAMP-Zugabe (Yeh et al 1978). So gehören diese Gene vermutlich zur selben Klasse wie M3/I42.

Eine zweite Gruppe von Genen, zu denen K5 und M4-1 (Kimmel and Carlisle 1986) gehört, wird sehr früh in der Entwicklung, schon nach 2 Stunden, maximal exprimiert. Zugabe von externen cAMP-Pulsen führt zu einer Repression der Expression, wohingegen kontinuierliche Zugabe von cAMP keinen Effekt auf die Expression dieser Gene hat (Mann and Firtel 1987).

Die dritte Gruppe schließlich umfaßt die Discoidin-Multigenfamilie. Die zeitliche Kinetik der Discoidinexpression entspricht etwa der von M3/I42. Ebenso wie die M3/I42-Gene wird ihre Expression durch kontinuierliche cAMP-Gaben reprimiert, im Gegensatz zu M3/I42 haben jedoch nanomolare Pulse von cAMP keinerlei Einfluß auf ihre Expression (Williams et al 1980, Mann and Firtel 1987).

Über welchen Mechanismus extern appliziertes cAMP zu einer Induktion der Genexpression führt, ist unbekannt. Aufschluß geben Versuche, die in Gegenwart von Koffein durchgeführt wurden. Durch Zugabe von Koffein kann endogenes Pulsen vollständig unterbunden werden, da Koffein eine Aktivierung der Adenylatcyclase verhindert (Brenner und Thoms 1984). In koffeinbehandelten Kulturen erfolgt keine Expression von M3/I42 (Mann and Firtel 1987).

Dies wird als Hinweis gedeutet, daß endogene cAMP-Pulse das in vivo Signal für die Regulation der Expression dieser frühen Gene darstellt.

Die beobachtete Repression der M3/I42-Expression bei kontinuierlicher cAMP-Zugabe wird als Adaptationsphänomen gedeutet (siehe Adaptation während Aggregation). Sehr wahrscheinlich sind dieselben Rezeptoren, die auch für die Chemotaxis verantwortlich sind, an der Induktion früher Gene mittels cAMP beteiligt.

Über die weiterleitenden Signale, nach Bindung von cAMP an die Rezeptoren, ist jedoch wenig bekannt. Eine Aktivierung der Adenylatcyclase und daraus resultierender Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration (wie während der Aggregation) ist jedoch aller Wahrscheinlichkeit nach nicht erforderlich, wie Versuche in Gegenwart von Koffein *und* externen cAMP-Pulsen zeigen. Durch die Anwesenheit von Koffein kann zwar die Adenylatcyclase nicht aktiviert werden, und endogenes Pulsen kann nicht stattfinden, trotzdem führen jedoch externe Pulse zu einer Induktion der frühen Gene M3/I42 (Mann and Firtel 1987). Dies zeigt, daß nach Bindung von cAMP an die Rezeptoren nicht die Aktivierung der Adenylatcyclase, sondern ein anderer dadurch ausgelöster Schritt essentiell ist, wie z.B. eine Aktivierung der Guanylatcyclase, die durch Koffein nicht inhibiert wird (unveröffentlichte Beobachtung zitiert in Mann and Firtel 1987).

Postaggregative Gene

Weitere Gene, deren Regulation gut untersucht wurde, sind die zelltypspezifischen, sogenannten postaggregativen, späten Gene. Von zwei Arbeitsgruppen wurden cDNA-Klone isoliert, die spezifisch mit mRNAs aus prespore- oder prestalk-Zellen hybridisieren (Mehdy et al 1983, Barklis and Lodish 1983). Die auf diese Weise gefundenen prespore-spezifischen Klone wurden in zwei Gruppen eingeteilt, in prespore I- und prespore II-Klone. Prespore-I-mRNAs beginnen schon sehr früh zu akkumulieren (4 - 8 Stunden nach Nahrungsentzug), während prespore II-mRNAs erst nach Abschluß der Aggregation, frühestens nach 12 Stunden, auftauchen. Beide mRNA-Klassen erreichen ihr Maximum der Expression im Slugstadium und sind fast ausschließlich in prespore-Zellen zu finden. Die Spezifität der prespore I-mRNAs ist geringer als die der prespore II-mRNAs (Barklis and Lodish 1983).

Die prestalk-spezifischen Klone hybridisieren alle mit mRNAs aus frühen Aggregationsphasen (8 Std.). Ein Maximum dieser mRNAs ist im tipstadium zu finden, danach werden sie rapide abgebaut. Im Slugstadium selbst herrscht nur noch ein geringer Level dieser mRNAs, und sie ist preferentiell in prestalk-Zellen zu finden. Diese Beobachtungen lassen die Vermutung aufkommen, daß es sich hier nicht um Gene handelt, die spezifisch nur in prestalk-Zellen aktiviert werden, sondern daß dies Gene sind, die zuerst in allen Zellen exprimiert werden, und die später nur prestalk-spezifisch erscheinen, da eventuell der generelle turnover von RNA in prestalk-Zellen langsamer vonstatten geht als in prespore-Zellen (Datta et al 1987).

In aggregationskompetenten Zellen kann die Expression prestalk- und prespore-spezifischer Gene sowohl durch cAMP-Pulse (Chisholm et al 1984, Schaap and van Driel 1985, Haribabu and Dottin 1986) als auch durch kontinuierliche Gaben an cAMP induziert werden (Mehdy et al 1983, Schaap and van Driel 1985, Haribabu and Dottin 1986, Oyama and Blumberg 1986a).

Dies unterscheidet sie ganz wesentlich von der großen Gruppe der frühen Gene, die nur durch Pulse, nicht durch kontinuierliche Gaben an cAMP, induziert werden können. Die Regulation später Gene scheint unter nonadaptiver Kontrolle zu stehen.

Lange Zeit wurde vermutet, daß mit cAMP nur dann eine Induktion der prespore II-Genexpression erreicht werden kann, wenn zusätzlich die Ausbildung von Zellkontakten ermöglicht wird (Chung et al 1981, Barklis and Lodish 1983, Mehdy et al 1983, Chisholm et al 1984). Nur in einigen sporogenen Mutanten konnte durch cAMP prespore- und Sporen-differenzierung auch in Abwesenheit von Zellkontakten induziert werden (Kay and Trevan 1981, Kay 1982). Neuere Untersuchungen zeigten jedoch, daß auch in Wildtypzellen prespore-spezifische Gene durch cAMP in Einzelzellen induziert werden können (Mehdy and Firtel 1985). Jedoch ist zusätzlich zu cAMP noch ein anderer, von den Zellen ins Medium sezernierter Faktor, CMF (conditioned medium factor), nötig.

Auch in Gegenwart von Koffein führt cAMP-Zugabe zu einer Induktion postaggregativer Genexpression, so daß also eine Aktivierung der Adenylatcyclase kein essentieller Schritt in der Weiterleitung des cAMP-Signals darstellt (Gomer et al 1986a).

Intrazelluläres cAMP scheint also weder bei der Induktion preaggregativer, noch bei der Induktion postaggregativer Genexpression die Rolle eines second messengers zu übernehmen.

Beteiligung cAMP-spezifischer Rezeptoren an der Weiterleitung extrazellulären cAMPs

Extrazelluläres cAMP kann die Expression postaggregativer Gene in aggregationskompetenten Zellen induzieren oder, nach Disaggregation multizellulärer Gebilde, die Expression später Gene stabilisieren. Auf welchem Wege dies zustande kommt, ist unbekannt. Über den ersten Schritt in der Weiterleitung des cAMP-Signals herrschen verschiedene Vorstellungen in der Literatur. Im wesentlichen werden zwei Möglichkeiten erörtert. Entweder cAMP bindet, ähnlich wie Hormone in höheren Organismen, an außen in der Membran lokalisierte Rezeptoren, oder cAMP gelangt in die Zelle und bindet an intrazelluläre cAMP-Rezeptoren, z.B. an die cAMP-abhängige Proteinkinase. Die Beobachtung, daß sehr hohe Konzentrationen an cAMP benötigt werden, um späte Gene zu induzieren (0.3 - 1 mM), spricht, unter Berücksichtigung der entsprechenden Dissoziationskonstanten, auf den ersten Blick gegen eine Beteiligung cAMP-spezifischer Rezeptoren. Die Dissoziationskonstanten sind um 2-3 Zehner-potenzen geringer als die zur Geninduktion benötigten cAMP-Konzentrationen.

Die benötigten hohen Konzentrationen an cAMP wurden von einigen Gruppen als Hinweis dafür angesehen, daß ein Teil des cAMP in die Zelle diffundiert und dort z.B. an die cAMP-abhängige Proteinkinase bindet (Rutherford et al 1982, Leichtling et al 1984, Schaller et al 1984, Vaughan and Rutherford 1987).

cAMP-spezifische Rezeptoren und cAMP-abhängige Proteinkinase unterscheiden sich beträchtlich in ihrer Affinität für bestimmte cAMP-Derivate. Mehrere Gruppen haben daher die Spezifität verschiedener cAMP-Derivate bezüglich Induktion

postaggregativer Differenzierung getestet (Schaap and van Driel 1985, Oyama and Blumberg 1986a, Haribabu and Dottin 1986, Gomer et al 1986a). Diejenigen Derivate, die eine hohe Affinität zu cAMP-spezifischen Rezeptoren aufweisen, jedoch nur sehr geringe Affinität zur Proteinkinase (z.B. 2-Deoxy-cAMP), sind auch in der Lage, postaggregative Differenzierung zu induzieren. Andererseits sind Analoge mit hoher Affinität zur Proteinkinase, aber geringer Affinität zu Rezeptoren, unfähig, postaggregative Differenzierung zu induzieren (z.B. 8-Bromo-cAMP). Dies wird im allgemeinen als Beweis für die Beteiligung cAMP-spezifischer Rezeptoren angesehen. Allerdings bleibt noch die Möglichkeit eines intrazellulären cAMP-Bindungsproteins mit ähnlichen Spezifitäten für cAMP-Analoga wie die Rezeptoren. Jedoch wurde bisher noch kein derartiges Protein beschrieben. Die Bindung von cAMP an die zellmembrangebundenen cAMP-spezifischen Rezeptoren scheint daher am plausibelsten.

Zelltypdifferenzierung

Ein besonders interessanter Aspekt der Entwicklungsbiologie ist die Frage nach der Entstehung verschiedener Zelltypen. Auch in *Dictyostelium discoideum* kann dieses Phänomen verfolgt werden. Während aggregierende Zellen alle identisch zu sein scheinen, können bereits ab dem tipstadium zwei Zelltypen unterschieden werden. Es existieren verschiedene zelltyp-spezifische Marker, wie Antikörper gegen prespore- (Takeuchi 1963, Gregg et al 1982, Tasaka et al 1983, Gomer et al 1986b) und prestalk-spezifische Antigene (Tasaka et al 1983, Krefft et al 1985, Gomer et al 1986b), zelltypspezifische Enzyme (van Lookeren Campagne and Lowik 1985, Newell et al 1969, Armant et al 1980, Oohata 1983, 1986) und cDNA-Klone gegen zelltyp-spezifisch exprimierte Gene (Barklis and Lodish 1983, Mehdy et al 1983, Raymond et al 1984).

Im Slugstadium sind prestalk- und prespore-Zellen bereits in einem charakteristischen Muster angeordnet, prestalk-Zellen befinden sich in der anterioren Region, prespore-Zellen in der posterioren Region. In der posterioren Zone liegen außerdem, verstreut zwischen den prespore-Zellen, sogenannte anterior-like-Zellen. Dies sind Zellen, die in fast allen Eigenschaften

den prestalk-Zellen ähneln, jedoch posterior lokalisiert sind (Sternfeld and David 1981, 1982, Voet et al 1985, Devine and Loomis 1985).

Die Proportionen der Zelltypen zueinander sind immer konstant und unabhängig von der Größe des Slugs (Bonner 1957, Williams et al 1981). Die Zelltypproportionen sind jedoch von Stamm zu Stamm verschieden, und es wurden Mutanten beschrieben, bei denen der Anteil prestalk-Zellen erhöht oder erniedrigt ist (Mac Williams 1982, Blaschke et al 1986, Newell and Ross 1982a). Eine Änderung der Proportionen kann man ebenfalls durch Variation der Wachstumsmedien erreichen (Garrod and Ashworth 1972, Forman and Garrod 1977).

Werden die Zelltypproportionen künstlich zerstört, z.B. durch Entfernen von prestalk- oder prespore-Teilen, erfolgt eine teilweise Umdifferenzierung der verbliebenen Zellen, so daß nach einer gewissen Zeit ein regenerierter Slug mit den ursprünglichen prestalk/prespore-Proportionen entsteht (Sternfeld and David 1982, Takeuchi et al 1982). Dies zeigt zum einen, daß die Zelltypproportionen einer strengen Kontrolle unterworfen sind, und zum anderen, daß prestalk- und prespore-Zellen noch nicht irreversibel differenziert sind.

Das prestalk/prespore-Zell-Muster könnte entweder durch positionsabhängige Differenzierung (Mac Williams and Bonner 1979, Meinhardt 1983) oder durch Aussortieren bereits differenzierter Zellen entstehen (Takeuchi 1963, Garrod and Forman 1977). Letzteres impliziert, daß die Zellen in einem Aggregathaufen zufällig (positionsunabhängig) ausdifferenzieren und dann, entsprechend ihres Differenzierungsstatus, in die jeweiligen Positionen wandern. Bisher konnte zwischen diesen beiden Möglichkeiten nicht eindeutig unterschieden werden.

Ein Modell wurde erstellt, wonach positionsunabhängige Differenzierung durch negative feedback-Mechanismen kontrolliert werden könnte (Mac Williams and David 1984, Mac Williams et al 1985, Blaschke et al 1986). Vereinfacht gesagt: prespore-Zellen produzieren Faktoren, die eine Differenzierung in prespore-Zellen inhibieren, und prestalk-Zellen produzieren Faktoren, die eine Differenzierung in prestalk-Zellen inhibieren. Die Schlußfolgerungen, die sich daraus ergeben, seien an einem konkreten Beispiel erläutert. Wie bereits

erwähnt, existieren Mutanten, die in ihren Zelltypproportionen geändert sind. Eine derartige Mutante ist Hs2. Sie besitzt eine verkleinerte prestalk-Zone (6 % prestalk) im Vergleich zum Wildtyp Hs1 (11 % prestalk). Hs1- und Hs2-Zellen können im vegetativen Zustand miteinander vermischt und zur Differenzierung gebracht werden. Beide Stämme aggregieren miteinander und bilden Slugs, die aus einer Mischung von Hs1- und Hs2-Zellen bestehen. Diese Mischslugs wurden nun unter zwei Aspekten betrachtet (Blaschke et al 1986):

a. es wurde ermittelt, ob Hs1- und Hs2-Zellen gleichmäßig in der prestalk- und prespore-Zone verteilt sind. In der Tat stellte sich heraus, daß in Mischungen Hs2-Zellen preferentiell zu prespore- und anterior-like-Zellen, und Hs1-Zellen preferentiell zu prestalk-Zellen differenzieren. Da Hs1- und Hs2-Zellen zu Beginn der Entwicklung gleichmäßig vermischt vorliegen, sind sie aller Wahrscheinlichkeit nach denselben Umweltsignalen ausgesetzt. Trotzdem zeigen sie unterschiedliche Differenzierungspräferenzen. Dies kann dahingehend interpretiert werden, daß Hs1- und Hs2-Zellen unterschiedlich sensitiv auf Faktoren reagieren, die die Zelltypdifferenzierung regulieren.

b. es wurden die Hs1- und Hs2-Zelltypproportionen *innerhalb* der Mischung bestimmt. Es zeigte sich, daß die Proportionen nicht autonom entstehen, sondern von der Gegenwart des anderen Stammes abhängen. Konkret gesagt, je mehr Hs2-Zellen in der Mischung vorhanden waren, desto geringer wurde der Anteil Hs1-prespore-, und desto höher der Anteil Hs1-prestalk-Zellen. Diegleiche Tendenz, wenn auch in geringerem Ausmaß, ließ sich auch für die Hs2-Zelltypproportionen in Mischungen nachweisen. Dies bedeutet, daß der Level der die Zelltypproportionierung steuernden Faktoren in verschiedenen Mischungen nicht konstant ist. Dies läßt sich dadurch erklären, daß in reinen Hs1- und reinen Hs2-slugs unterschiedliche Konzentrationen dieser Faktoren vorliegen, so daß der Level in Mischungen abhängig ist vom Mischungsverhältnis beider Partner.

Die Identifizierung solcher extrazellulärer Faktoren, die die Zelltypdifferenzierung steuern, ist z.Z. das Ziel mehrerer Arbeitsgruppen.

Mehrere Substanzen kommen als mögliche Kandidaten dafür in Frage. Die hauptsächlich zur Diskussion stehenden Moleküle sind cAMP, DIF (differentiation inducing factor), Ammonium und Adenosin.

cAMP

Am besten untersucht ist cAMP, das, wie bereits ausgeführt, die vielfältigsten Funktionen während der Differenzierung von *Dictyostelium discoideum* erfüllt. Mithilfe von cAMP kann nicht nur Genexpression induziert (wie bereits beschrieben) sondern auch stabilisiert werden. Disaggregation von Slugs führt zu einer Dedifferenzierung der Zellen, wenn eine Reaggregation verhindert wird (Soll and Waddell 1975, Waddell and Soll 1977, Finney et al 1979). Durch Zugabe von cAMP kann dies verhindert werden (Finney et al 1981). Sowohl auf Protein- als auch auf mRNA-Ebene konnte gezeigt werden, daß nach Disaggregation die prespore-spezifischen Genprodukte verschwinden. Zugabe von cAMP führt zu einer Stabilisierung der Genprodukte (Mehdy et al 1983, Barklis and Lodish 1983, Chisholm et al 1984, Oyama and Blumberg 1986b, Blumberg et al 1982, Chung et al 1981, Landfear and Lodish 1980, Mangiarotti et al 1983). cAMP-Zugabe nach Disaggregation von Slugs hat keinen Einfluß auf die Expression prestalk-spezifischer mRNAs (Oyama and Blumberg 1986b, und eigene Beobachtungen). Die stabilisierende Wirkung von cAMP in diesem Stadium ist nur prespore-spezifisch.

Unter bestimmten Bedingungen verhindert Zugabe von cAMP zu isolierten prespore-Teilen eine Umdifferenzierung in prestalk-Zellen. (Weijer and Durston 1985). Auch in diesem Fall scheint cAMP einen prespore-stabilisierenden Effekt auszuüben.

DIF

DIF (differentiation inducing factor), dessen Struktur erst kürzlich veröffentlicht wurde (Morris et al 1987), wird aus Zellextrakten isoliert und ist ein stielzellinduzierender Faktor (Town et al 1976, Town and Stanford 1979, Kay et al 1979, Kopachik et al 1983, Sobolewski et al 1983, Kay and Jermyn 1983). DIF-Produktion beginnt ab dem tipstadium und wird durch cAMP stimuliert (Brookman et al 1982). Maximale Produktion erfolgt während des Slugstadiums, und es wurde

gezeigt, daß DIF hauptsächlich in der prespore-Region produziert wird (Brookman et al 1987).

DIF inhibiert prespore-Differenzierung und die Synthese sporenspezifischer Proteine (Kay and Jermyn 1983). Außerdem kann durch DIF die cAMP-induzierte Expression prespore-spezifischer Gene inhibiert werden (Wang et al 1986). DIF-ähnliche Effekte können auch durch Zugabe schwacher Säuren hervorgerufen werden. Durch Zugabe schwacher Basen, wie z.B. Ammonium, kann DIF entgegengewirkt werden. Dies führte zur Theorie, daß der Wirkungsmechanismus von DIF in einer Senkung des pH-Werts besteht (Gross et al 1983, Town 1984). Durch direkte pH-Messungen in Zellen konnte diese Theorie jedoch nicht bestätigt werden (Kay et al 1986).

Ammonium

Ammonium wird als Gegenspieler von DIF angesehen (Gross et al 1983, Schaap 1986) und ist ein sporeninduzierendes Agens (Oyama and Blumberg 1986c, Sternfeld and David 1979, Sussman and Schindler 1978, Gross et al 1983). Als weitere sporen-induzierende, jedoch sonst noch wenig charakterisierte Faktoren, wurden SPIF und PIF beschrieben (Wilkinson et al 1985, Kumagai and Okamoto 1986).

Adenosin

Adenosin entsteht durch Abbau von cAMP durch die cAMP-spezifische Phosphodiesterase und 5'Nucleotidase und begünstigt prestalk-Differenzierung. Zugabe von Adenosin zu regulierenden prestalk-Teilen führt zu einer Verschiebung der Proportionen zugunsten von prestalk-Zellen (Weijer and Durston 1985). Außerdem inhibiert Adenosin die cAMP-induzierte Expression prespore-spezifischer Marker (Schaap and Wang 1986).

Diese Arbeit beschäftigt sich mit dem Einfluß von cAMP auf die zelltypspezifische Differenzierung und Proportionierung. In Anlehnung an das eingangs erwähnte Modell könnte cAMP die Rolle eines feedback-Inhibitors übernehmen. Es existieren mehrere Hinweise dafür, daß der cAMP-Spiegel in der anterioren Region 40 - 70 % höher ist als im übrigen Sluggewebe. Dies wurde durch verschiedene Methoden wie Chemotaxis auf cAMP

(Bonner 1949, Garrod and Malkinson 1973), Immunofluoreszenz (Pan et al 1974) und cAMP-bindungsassays (Brenner 1977, Merkle et al 1984) nachgewiesen.

cAMP könnte somit hauptsächlich von prestalk-Zellen produziert werden und als negatives feedback-Signal wirken, indem es prestalk-Differenzierung inhibiert und prespore-Differenzierung begünstigt.

In dieser Arbeit habe ich versucht, die Vorhersagen zu untersuchen, die sich aus der Anwendung des negativen feedback-Modells mit cAMP als ein feedback-Signal ergeben.

- a. unterscheiden sich Hs1- und Hs2-Zellen in ihrer Sensitivität auf cAMP?
- b. unterscheiden sich Hs1- und Hs2-Zellen in ihrem cAMP-Gehalt?

Ergebnisse

1. Kurze Charakterisierung der verwendeten Stämme

Der Stamm Hs1 entstand aus NC4b durch Mutagenese und unterscheidet sich von NC4b nur durch eine verlängerte Migrationsphase der Slugstadien auf Wasseragarplatten. Hs1-Zellen werden in dieser Arbeit als Wildtypzellen bezeichnet. Der Stamm Hs2 entstand aus Hs1 durch Mutagenese und wurde aufgrund seiner verkleinerten prestalk-Zone (sichtbar gemacht durch Neutralrotfärbung) selektioniert. Hs2⁻ unterscheidet sich in mehreren Punkten von Hs1.

1.1. Dauer der Preaggregations- und Aggregationsphase

Die zeitliche Kinetik der Entwicklung ist bei Hs2 sehr variabel. Wenn von vegetativen Zellen ausgegangen wird, dauert die Preaggregations- und Aggregationsphase 20 - 30 Stunden und ist somit immer länger als bei Hs1, wo die Aggregation nach 12 - 14 Stunden abgeschlossen ist.

1.2. Postaggregative Differenzierung

Aggregationsströme von Hs2-Zellen zeigen oft eine Aufsplitterung in mehrere unabhängige Aggregationszentren (siehe Fig. 2). Auch die Bildung mehrerer tips aus einem Aggregationszentrum kann oft beobachtet werden (siehe Fig. 3). Dies ist möglicherweise auf die, durch Transplantationsexperimente nachgewiesene, verminderte "tipinhibition" zurückzuführen (Mac Williams 1982).

Der Zeitraum zwischen tipformation und Slugbildung ist bei Hs2 unverändert geblieben.

Hs2-slugs zeigen, im Gegensatz zu Hs1-slugs, nur geringe Tendenz zu migrieren, sind im Durchschnitt kürzer und dicker als Hs1-slugs und besitzen eine verkleinerte, durch Neutralrot färbare, anteriore Region (siehe Fig. 4 und 5).

Durch Färbung mit Anti-prespore-Antiserum wurden die Zelltypproportionen bestimmt, und sie belaufen sich auf 6 % prestalk-, 84 % prespore- und 10 % anterior-like-Zellen bei Hs2, und 11 % prestalk-, 80 % prespore- und 9 % anterior-like-Zellen bei Hs1 (Blaschke et al 1986).

In Experimenten, in denen vegetative Hs1- und Hs2-Zellen vermischt wurden, differenzieren Hs2-Zellen preferentiell zu prespore- und anteriorlike-Zellen, Hs1-Zellen differenzieren preferentiell zu prestalk-Zellen.

1.3. Fruchtkörperbildung

Im Gegensatz zu Hs1 ist eine Differenzierung in Stiel- und Sporenzellen bei Hs2 inhibiert, wenn die Differenzierung auf Wasseragarplatten stattfindet. Erfolgt eine Differenzierung jedoch auf mit Puffer getränkten Filterplättchen, sind auch Hs2-Zellen in der Lage, Fruchtkörper zu bilden.

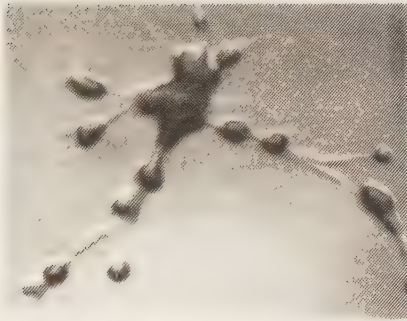


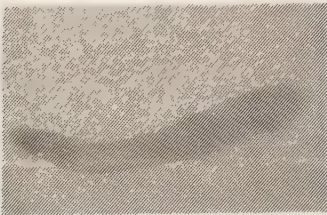
Fig. 2

Spätes Aggregationsstadium von Hs2



Fig. 3

Bildung mehrerer tips aus einem Aggregationszentrum bei Hs2



Hs1



Hs2

Fig. 4 + 5

Neutralrotgefärbte Hs1- und Hs2-slugs

Die neutralrot gefärbte Zone umfaßt die prestalk-Zone der slugs.

2. cAMP-Spiegel in slugs

Ausgehend von der, in der Einleitung beschriebenen Hypothese, wurde getestet, ob Hs1- und Hs2-Zellen demselben "Inhibitor-level" in Slugs ausgesetzt sind. Dazu wurde die cAMP-Konzentration in Hs1- und Hs2-slugs ermittelt. Gemessen wurde dabei die totale cAMP-Konzentration, d.h. die Summe aus intra- und extrazellulärem cAMP. Die Daten sind in Tab.1 zusammengestellt. Es konnte kein Unterschied zwischen Hs1- und Hs2-slugs festgestellt werden.

Tab.1

Stamm	slugs, Alter in Stunden	pmol cAMP/10 ⁷ Zellen
Hs1	5	12.1
	6	11.3
	7	10.9
	8	14.9
		M = 12.3 ± 1.7
Hs2	14	10.6
	15	14.8
	16	19.3
	17	16.3
	18	11.3
	19	15.0
		M = 14.5 ± 3.2

Tab.1

cAMP-Spiegel in Hs1- und Hs2-slugs

Hs1- und Hs2-Zellen wurden auf Salzplatten ausplattiert und 12 Stunden bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Platten in 22°C transferiert, dies gilt als Zeitpunkt 0. Hs1-Zellen bildeten erstmals 5 Stunden nach Beginn der Inkubation bei 22°C slugs, Hs2-Zellen erst nach 14 Stunden.

Slugs wurden mit einem feinen Pinsel von der Agaroberfläche abgeschabt, von den mitabgeschabten, nichtaggregierten Einzelzellen mittels Filtration durch ein Nylontuch befreit und der cAMP-Gehalt, wie in Material und Methoden beschrieben, bestimmt.

Um dieses Ergebnis zu bekräftigen, wurde zusätzlich die Aktivität der cAMP-synthetisierenden und -degradierenden Enzyme bestimmt.

3. Aktivität der Adenylatcyclase

Adenylatcyclase ist das Enzym, das die Bildung von cAMP aus ATP katalysiert. Seine Aktivität steigt in den ersten Stunden der Entwicklung mit Ausbildung des chemotaktischen Systems stark an (Pahlic and Rutherford 1979, Merkle and Rutherford 1984).

3.1. basale Aktivität

Die basale Aktivität der Adenylatcyclase wurde über den gesamten Entwicklungsverlauf hinweg bestimmt (siehe Fig. 6).

Die Adenylatcyclase-Aktivität ist relativ gering in aggregationskompetenten Zellen (nach 12 Stunden Inkubation bei 4°C), steigt dann stetig an und erreicht einen Peak an Aktivität auf dem Höhepunkt der Aggregation. Diese Peakaktivität ist in aggregierenden Hs1- und Hs2-Zellen gleich hoch. Mit dem Einsetzen der tipbildung nimmt die basale Aktivität ab und bleibt auf diesem niedrigen Niveau während des Slugstadiums. Bei der Kulmination der Hs1-slugs ist erneut ein Anstieg an Aktivität zu beobachten.

Wie bereits eingangs erwähnt, unterscheidet sich Hs2 von Hs1 u.a. durch eine verlängerte Aggregationsphase. Der Anstieg der Adenylatcyclase-Aktivität ist bei Hs2-Zellen dementsprechend langsamer und mehr in die Länge gezogen, dasselbe gilt für den Abfall der Aktivität. An markanten, morphologisch eindeutig zu

erkennenden Punkten der Entwicklung, ist die Aktivität jedoch gleich hoch in Hs1- und Hs2-Zellen, z.B. bei Bildung von Strömen (vgl. 3 Stunden bei Hs1 mit 10 Stunden bei Hs2) oder Bildung von tips (vgl. 4 Stunden bei Hs1 mit 14 Stunden bei Hs2).

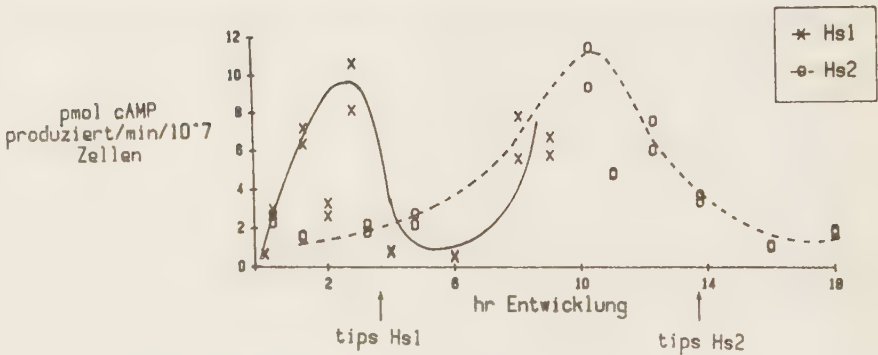


Fig. 6

Entwicklungsregulierte Aktivität der Adenylatcyclase

Hs1- und Hs2-Zellen wurden auf Salzplatten ausplattiert und 12 Stunden bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Platten in 22°C transferiert, dies gilt als Zeitpunkt 0. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde eine Agarplatte mit KK_2 -Puffer abgespült, die Zellen pelletiert, in HB-Puffer resuspendiert und bei -20°C eingefroren. Der Adenylatcyclase-assay wurde, wie in Material und Methoden beschrieben, durchgeführt.

3.2. Aktivierung der Adenylatcyclase

Aggregierende Zellen sind in der Lage, ein cAMP-Signal, das sie empfangen, weiterzuleiten. Extrazelluläres cAMP bindet mittels cAMP-spezifischer Rezeptoren an die Zellmembran, was zu einer Stimulierung der, auf der Innenseite der Membran lokalisierten, Adenylatcyclase führt. Daraufhin wird cAMP intrazellulär gebildet und nach außen abgegeben. Die Synthese und Sekretion von cAMP als Antwort auf einen cAMP-Stimulus wird als "relay" bezeichnet.

Hs1- und Hs2-Entwicklungsstadien wurden ausgesucht, die sich, nach morphologischen Kriterien beurteilt, in einem ähnlichen Entwicklungszustand befanden. Die produzierte Menge an cAMP als Folge eines cAMP-Stimulus wurde gemessen. In der Praxis wird mit einem cAMP-Analog stimuliert, um den Stimulus selbst vom produzierten cAMP unterscheiden zu können.

Wie aus Tab. 2 ersichtlich wird, konnte wiederum kein gravierender Unterschied zwischen Hs1- und Hs2-Zellen festgestellt werden.

Tab. 2

Entwicklungsstadium	pmol cAMP/mgr Protein	
	Hs1	Hs2
ripple	77.7 $\pm$ 10	39.0 $\pm$ 5.6 58.3 $\pm$ 3.8
Ströme	50.6 $\pm$ 11 118.0 $\pm$ 2.3	77.7 $\pm$ 4.6 82.2 $\pm$ 16.1
Hügel	23.0 $\pm$ 1.7	34.0 $\pm$ 2.9

Tab. 2

cAMP-Produktion nach Stimulation mit cAMP

Hs1- und Hs2-Zellen wurden auf Salzplatten ausplattiert und 12 Stunden bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Platten bei 22°C inkubiert und morphologisch vergleichbare Stadien ausgewählt. Die Zellen wurden 3 min lang mit 2'Deoxy-cAMP stimuliert, anschließend lysiert und der cAMP-Gehalt des Lysats mithilfe eines kommerziell erhältlichen kits (Amersham) bestimmt.

4. Aktivität der cAMP-spezifischen Phosphodiesterase

Die Phosphodiesterase ist das einzig bekannte Enzym, das die Hydrolyse zyklischer Nukleotide katalysiert. Somit spielt die cAMP-spezifische Phosphodiesterase vermutlich eine wichtige Rolle bei der Regulation des cAMP-Spiegels in vivo.

Bei *Dictyostelium*-Zellen existiert eine zelluläre und eine extrazelluläre Form der Phosphodiesterase. Zur zellulären Form zählt sowohl die membrangebundene als auch die intrazellulär lokalisierte Phosphodiesterase (Malchow et al 1972, Malkinson and Ashworth 1973, Klein and Darmon 1975). Extrazelluläre Phosphodiesterase konnte aus dem Medium hungernder Zellen isoliert werden (Chassy 1972).

Im folgenden habe ich die Aktivität der zellulären Phosphodiesterase während der Aggregation, im Slugstadium und in suspensionsgehungerten Zellen untersucht.

4.1. Entwicklungsregulierte Aktivität der Phosphodiesterase

Zellen wurden vom Wachstumsmedium befreit, auf Salzplatten ausplattiert und 12 Stunden bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden sie bei 22°C inkubiert und stündlich ihre Phosphodiesteraseaktivität bestimmt. Nach 12 Stunden Inkubation bei 4°C haben die Zellen Aggregationskompetenz erlangt, und die Phosphodiesterase hat bereits ihr Maximum an Aktivität erreicht (siehe Fig. 7). Die Aktivität bleibt auf diesem Niveau bis die Aggregation abgeschlossen ist. Danach beginnt sie zu sinken, und Zellen im Slugstadium besitzen nur noch etwa 1/5 der Aktivität des Aggregationsstadiums. Hs1- und Hs2-Zellen erreichen beide dieselbe maximale Aktivität. Ebenso ist die Regulation der

Phosphodiesterase, nach morphologischen Kriterien beurteilt, identisch. Die Aktivität der Phosphodiesterase bleibt hoch, solange die Aggregation noch im Gange ist. Dies dauert bei Hs1 3 Stunden, bei Hs2 9-13 Stunden. Das darauffolgende Absinken der Phospho-diesterase-Aktivität ist in beiden Stämmen eindeutig korreliert mit der Bildung von tips.

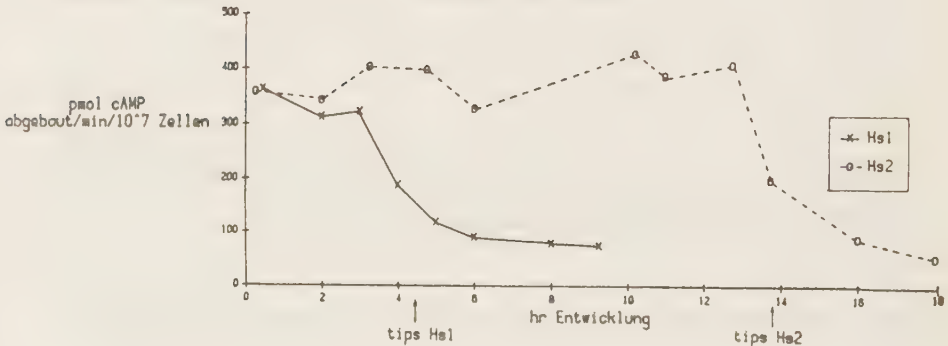


Fig. 7

Entwicklungsregulierte Phosphodiesteraseaktivität

Hs1- und Hs2-Zellen wurden auf Salzplatten ausplattiert und 12 Stunden bei 4°C inkubiert. Danach wurden die Platten nach 22°C transferiert, dies gilt als Zeitpunkt 0. Anschließend wurde stündlich die Phosphodiesteraseaktivität bei einer Substratkonzentration von 50 μ M cAMP bestimmt. Die Daten stellen die Mittelwerte aus 3 (Hs1) bzw. 2 (Hs2) unabhängig voneinander vorgenommenen Entwicklungsserien dar. Im Falle von Hs2 fand tipbildung in einer Entwicklungsreihe nach 14 Stunden, in der zweiten Serie jedoch schon nach 10 Stunden statt. Zur Berechnung der Mittelwerte wurden die Werte der zweiten Serie ab 10 Stunden um 4 Stunden zeitversetzt, so daß also der 10-Stunden-Wert des zweiten Experiments dem 14-Stunden-Wert des ersten Experiments gleichgesetzt wurde.

4.2. Phosphodiesterase-Aktivität in suspensionsgehungerten Zellen

Hs1- und Hs2-Zellen wurden von ihrem Wachstumsmedium befreit, in KCl_2 -Puffer (50 mM, pH 6.2) aufgenommen und 3 Stunden lang durch Schütteln gehungert. Danach wurden sie gewaschen und ihre Phosphodiesteraseaktivität nach Zugabe verschiedener Substratkonzentrationen ermittelt. Im Bereich von 0.1 bis 10 μM folgt das Enzym einer einfachen Michaelis-Menten-Kinetik mit einer K_m von etwa 2.6 μM , sowohl bei Hs1- als auch bei Hs2-Zellen (siehe Fig. 8). Bei höheren Substratkonzentrationen (20 - 50 μM) wird jedoch wesentlich mehr cAMP abgebaut als bei einem Enzym mit einer K_m von 2.6 μM zu erwarten wäre. Dies läßt auf die Existenz einer weiteren Enzymform mit einem hohen K_m -Wert schließen. In diesem Falle liegt die zweite Dissoziations-konstante im Bereich von 0.1 - 0.3 mM.

4.3. Phosphodiesterase-Aktivität in Slugzellen

Slugzellen, das eigentlich interessante System bezüglich Zelltypregulation, besitzen eine sehr geringe Aktivität an Phosphodiesterase im Vergleich mit aggregierenden Zellen (siehe auch Fig. 7).

Hs1- und Hs2-slugs wurden einzeln gesammelt, um eine Kontamination mit nichtaggregierten Zellen zu vermeiden. In Vorversuchen konnte gezeigt werden, daß nichtaggregierte Zellen eine sehr hohe Phosphodiesterase-Aktivität aufweisen (Daten nicht gezeigt). Die Phosphodiesterase-Aktivität der Slugzellen

wurde bei einer Substratkonzentration von 50 μM ermittelt und ist in Tab. 3 dargestellt.

Hs2-Zellen zeigen einen leichten, jedoch nicht signifikant erhöhten Aktivitätspegel. Ein Zusammenhang zwischen dem Alter der Slugs und der Phosphodiesterase-Aktivität konnte nicht festgestellt werden.

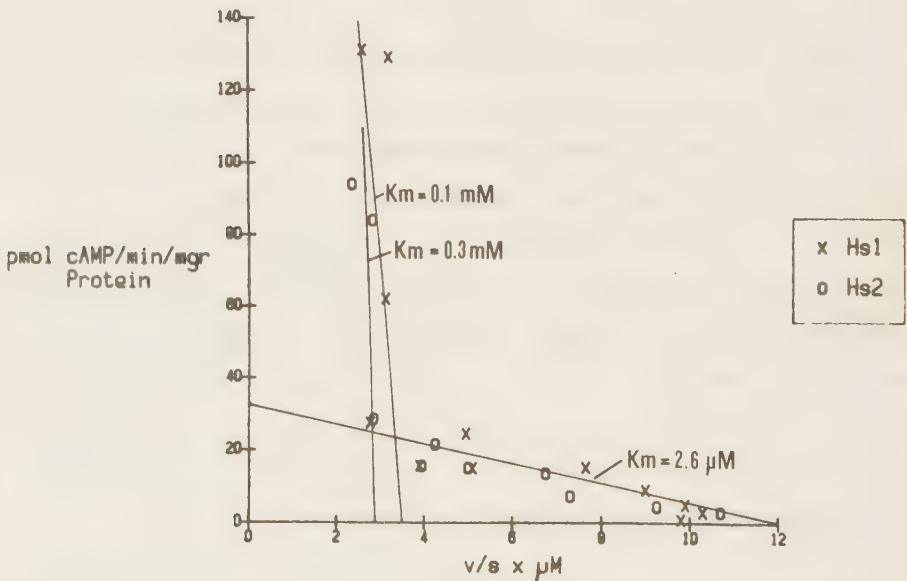


Fig. 8

Eadie-Hofstee-Plot der Phosphodiesteraseaktivität
suspensionsgehungelter Zellen

Hs1- und Hs2-Zellen wurden durch dreimaliges Waschen vom Wachstumsmedium befreit, in KCl_2 -Puffer (50 mM, pH 6.2) aufgenommen und 3 Stunden lang geschüttelt. Die Zellen wurden dann erneut dreimal gewaschen und ihre Phosphodiesteraseaktivität bei einer Substratkonzentration von 0.1 bis 50 μM cAMP getestet. Die Daten sind die Mittelwerte aus jeweils zwei unabhängigen Experimenten und sind in Form eines Eadie-Hofstee-Plots aufgetragen (Hofstee 1952). Bei dieser Art der Auftragung (v/s gegen v) ergibt die Steigung $-K_m$, der Schnittpunkt mit der y-Achse ist gleichbedeutend mit $v_{\max}$, der Schnittpunkt mit der x-Achse ist $v_{\max}/K_m$.

Tab. 3

Hs1		Hs2	
Alter der slugs, Std.	pmol/min/mgr	Alter der Slugs, Std.	pmol/min/mgr
20	53	23	94
24	52	26	69
26	30	41	89
26	70	65	66
40	34	70	75
45	63	70	85
50	54		
64	41		M = 79 ± 11
67	52		
70	75		
M = 52 ± 14			

Tab. 3

Phosphodiesteraseaktivität in Slugzellen

Hs1- und Hs2-Zellen wurden 3x gewaschen, in 1 Pelletvolumen KK_2 -Puffer aufgenommen, 25 μl dieser Zellsuspension auf Wasseragarplatten getropft und bei 22°C im Dunkeln inkubiert.

Hs1- und Hs2-slugs wurden einzeln gesammelt und ihre Phosphodiesteraseaktivität bei einer Substratkonzentration von 50 μM cAMP, wie in Material und Methoden beschrieben, bestimmt

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß aufgrund der gemessenen Daten keine Veranlassung besteht, einen gravierenden Unterschied in der Phosphodiesterase-Aktivität zu irgendeinem Zeitpunkt der Entwicklung anzunehmen.

5. AMP-Bindung

Alle bekannten Effekte von cAMP auf relay, Chemotaxis, Genexpression usw. werden über die cAMP-Rezeptoren an der Zelloberfläche vermittelt. Insofern war es von besonderem Interesse, die Bindung von cAMP in Hs1- und Hs2-Zellen zu untersuchen.

5.1. cAMP-Bindung während der Entwicklung

Hs1- und Hs2-Zellen wurden auf ihre cAMP-Bindungsaktivität im Verlauf ihrer Entwicklung untersucht. Dazu wurden die Zellen vom Bakterienmedium befreit, auf Salzplatten ausplattiert, stündlich Zellproben entnommen und ihre cAMP-Bindung gemessen (siehe Fig. 9 und 10).

Das Maximum der cAMP-Bindung erfolgt während der Aggregation, mit Ausbildung von tips und Slugstrukturen ist ein deutliches Absinken der Bindungsaktivität zu vermerken.

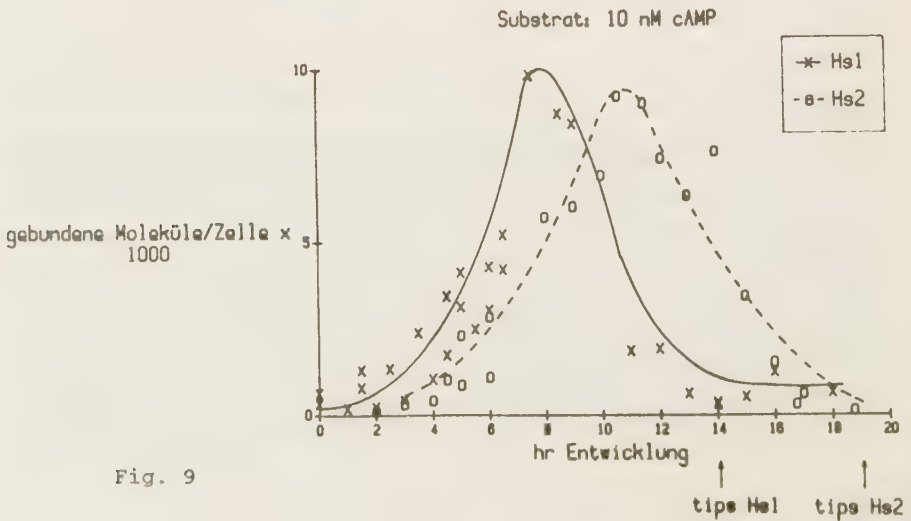


Fig. 9

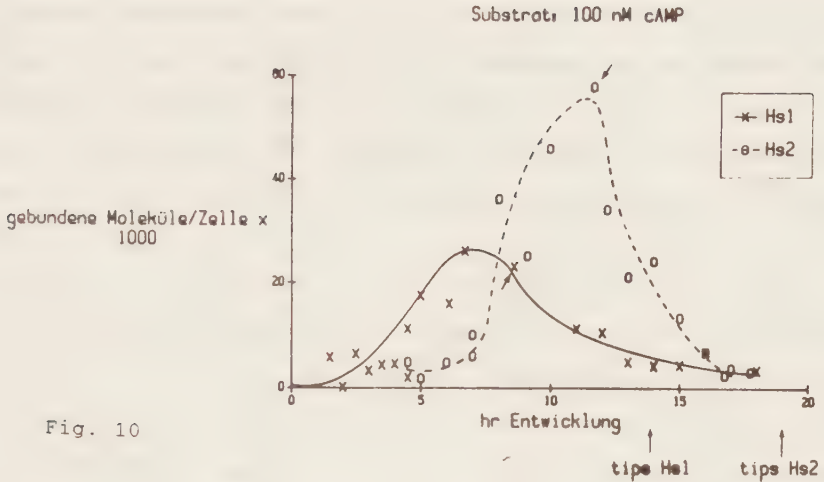


Fig. 10

Fig. 9 und 10

Entwicklungsregulierte cAMP-Bindungsaktivität bei Hs1- und Hs2-Zellen

Hs1- und Hs2-Zellen wurden auf Salzplatten ausplattiert und bei 22°C inkubiert. Stündlich wurde eine Platte mit KK_2 -Puffer abgespült, die Zellen auf 1×10^8 /ml konzentriert und ein cAMP-bindungsassay mit 10 nM cAMP (Fig. 9) oder 100 nM cAMP (Fig. 10) als Substrat durchgeführt.

Jeder Punkt repräsentiert den Mittelwert aus Duplo- oder Triplobestimmungen einer Messung. Die Gesamtzahl der Messungen wurde aus 6 (Hs1) bzw. 5 (Hs2) Experimenten ermittelt.

Der Pfeil gibt die Zellproben an, bei denen außerdem ein scatchardplot der cAMP-Bindung erstellt wurde (siehe Fig. 11).

Bei einer Substratkonzentration von 10 nM cAMP kann kein Unterschied in der maximalen Bindungsaktivität festgestellt werden (Fig. 9). Zu berücksichtigen ist jedoch, daß *Dictyostelium*zellen hoch- und niedrigaffine Bindungsstellen besitzen (Green and Newell 1975, Mullens and Newell 1978, Henderson 1975). Die gemessene Menge an gebundenem cAMP entspricht somit der Summe beider Bindungsaktivitäten. Bei Annahme einer K_d von 200 nM (Green and Newell 1975) für die niedrigaffine Bindungsaktivität sind, bei einer Substrat-

Konzentration von 10 nM, nur etwa 5 % dieser Rezeptoren besetzt. Beim hochaffinen Rezeptortyp (K_d 10 nM) sind etwa 50 % der Rezeptoren besetzt. Da jedoch pro Zelle etwa 10x mehr niedrigaffine als hochaffine Bindungsstellen vorhanden sind, beträgt der Anteil der niedrigaffinen Bindung an der gemessenen Bindungsaktivität etwa 50 %.

Bei einer Substratkonzentration von 100 nM sind 100 % der hochaffinen und 30 % der niedrigaffinen Rezeptoren besetzt. Der Beitrag der niedrigaffinen Bindung ist nun auf 80% der gemessenen Bindungsaktivität angestiegen. D.h. je höher die Substratkonzentration, desto mehr sind die niedrigaffinen Bindungsstellen an der gemessenen Bindungsaktivität beteiligt. Eine höhere maximale Bindungsaktivität, die nur bei hoher Substratkonzentration zu beobachten ist (Fig. 10), kann entweder auf einer vermehrten Anzahl niedrigaffiner Bindungsstellen oder auf einer höheren Affinität (kleinere K_d) dieser Bindungsstellen beruhen.

5.2. Bindungscharakteristik aggregierender Zellen

Der Zusammenhang zwischen der Dissoziationskonstanten, der Anzahl der Bindungsstellen und der gebundenen Menge cAMP ist in der folgenden Gleichung wiedergegeben:

$$RA = (R_0 \times A) / (K_d + A), \text{ wobei}$$

RA = rezeptorgebundene cAMP-Konzentration

A = freie cAMP-Konzentration

R_0 = Gesamtzahl der Bindungsstellen

K_d = Dissoziationskonstante

Um nun K_d und R_0 zu bestimmen, wurden Zellen, die sich auf dem Höhepunkt ihrer Bindungsaktivität befanden (siehe Fig. 9 und 10/Pfeil), mit einer Substratkonzentration von 0.1 bis 1000 nM cAMP inkubiert und die gebundene Menge cAMP gemessen. Die so erhaltenen Daten wurden in Form eines scatchardplots (Scatchard 1949) aufgetragen (Fig. 11).

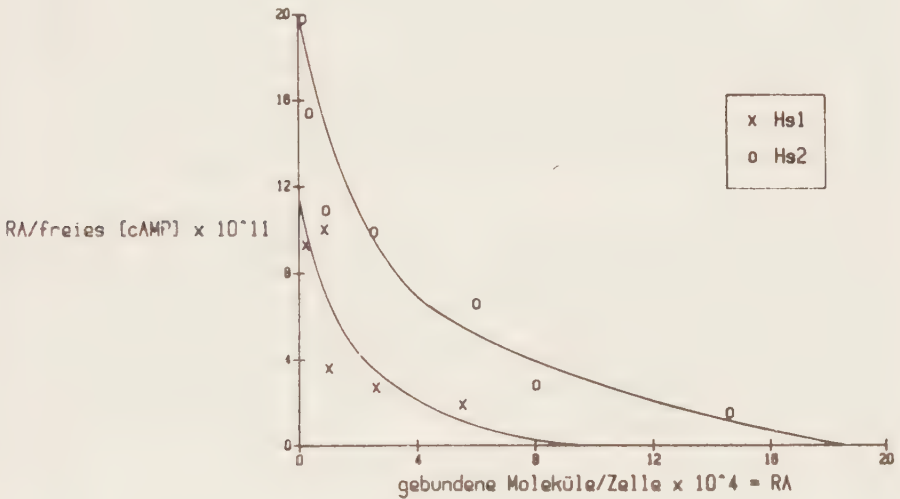


Fig. 11

Scatchardplot der cAMP-Bindungsaktivität aggregierender Zellen

Hs1-Zellen nach 8.5 Stunden und Hs2-Zellen nach 11.75 Stunden Entwicklung (siehe auch Fig. 9 und 10/Pfeil) wurden mit 0.1 bis 1000 nM cAMP inkubiert und ihre cAMP-Bindungsaktivität bestimmt. Jeder Punkt repräsentiert den Mittelwert aus Duplobestimmungen eines Experiments.

Die durchgezogene Linie ist die Kurve, die unter der Annahme, daß 2 Typen von Bindungsstellen vorliegen, berechnet wurde. Die zu dieser Berechnung benötigten Variablen K_d und R_0 wurden, wie im Text erläutert, ermittelt und lauten:

Hs1: $K_{d1} = 321 \text{ nM}$ / $R_{01} = 9 \times 10^4$ Bindungsstellen/Zelle
 $K_{d2} = 12 \text{ nM}$ / $R_{02} = 1 \times 10^4$ Bindungsstellen/Zelle

Hs2: $K_{d1} = 330 \text{ nM}$ / $R_{01} = 18.5 \times 10^4$ Bindungsstellen/Zelle
 $K_{d2} = 9 \text{ nM}$ / $R_{02} = 1.4 \times 10^4$ Bindungsstellen/Zelle

Die dem scatchardplot zugrundeliegende Gleichung ist lediglich eine Umformung der eben erwähnten Bindungsgleichung und lautet:

$$\frac{RA}{A} = \frac{RA - R_0}{-K_d}$$

wobei RA/A gegen RA aufgetragen wird.

Diese Art der Auswertung ergibt eine Gerade, wenn die Bindungsstellen alle gleichwertig und unabhängig voneinander sind. Am Schnittpunkt mit der x-Achse ist $RA = R_0$, die Steigung der Geraden ergibt die Reziproke der Dissoziationskonstanten. Mithilfe eines solchen scatchardplots kann also K_d und R_0 ermittelt werden.

Sind die Bindungsstellen jedoch nicht gleichwertig (z.B. mehrere Rezeptoren unterschiedlicher Affinität) oder unabhängig (z.B. kooperative Wechselwirkung), ergeben die Daten, mithilfe des scatchardplots aufgetragen, die Form einer hyperbolen Kurve (Addition zweier Geraden).

Solche Kurven, die man bei cAMP-Bindungsmessungen bei *Dictyostelium* erhält, können als die Summe zweier Bindungsaktivitäten unterschiedlicher Dissoziationskonstanten interpretiert werden. Die gemessene Menge RA ergibt sich somit aus der Summe

$$RA = (R_{01} \times A) / (K_{d1} + A) + (R_{02} \times A) / (K_{d2} + A)$$

Dabei bleibt ungeklärt, ob es sich tatsächlich um zwei Populationen von Rezeptormolekülen unterschiedlicher Affinität handelt oder um nur einen Rezeptortyp, der nach Bindung von cAMP seine Affinität erniedrigt (negative Kooperativität).

Um nun aus der Kurve in Fig. 11 die Werte für K_{d1} und K_{d2} und R_{01} und R_{02} zu berechnen, wurde zuerst die Assymptote an den

flachen Teil der Kurve ermittelt. Dieser Teil der Kurve repräsentiert fast ausschließlich die niedrigaffinen Bindungsstellen. Die hochaffinen Bindungsstellen fallen, obwohl sie zu 100 % besetzt sind, wegen ihrer geringen Anzahl kaum ins Gewicht. Die asymptotische Gerade liefert Werte für R_{01} und K_{d1} und somit RA_1 . Da $RA_{\text{GEMESSEN}} = RA_1 + RA_2$ kann somit RA_2 berechnet werden. Mithilfe dieses Werts kann ein zweiter scatchardplot gezeichnet werden (RA_2/A gegen RA_2), dessen Gerade R_{02} und K_{d2} liefert. Diese Daten dienen nun dazu, neue Werte für R_{01} und K_{d1} zu erhalten. Dieses Verfahren kann beliebig oft angewandt werden, bis die Summe $RA_1' + RA_2$ bestmöglich der tatsächlich gemessenen Bindungsaktivität entspricht.

Aus den gemessenen Daten ergibt sich, daß Hs2-Zellen etwa doppelt soviel niedrigaffine Bindungsstellen besitzen als Hs1. Die Dissoziationskonstante bleibt unverändert.

Beim hochaffinen Rezeptortyp sind sowohl Dissoziationskonstante als auch Anzahl der Stellen ähnlich.

5.3. Charakterisierung der cAMP-Bindung in Slugzellen.

Auch in Slugzellen konnten niedrig- und hochaffine Bindungsstellen für cAMP nachgewiesen werden (Schaap and Spek 1984), wenngleich auch die Gesamtzahl der Rezeptoren, im Vergleich zu aggregierenden Zellen, stark gesunken ist. Um zu testen, ob der in aggregierenden Zellen gefundene erhöhte Anteil niedrigaffiner Bindungsstellen auch in Slugzellen fortbesteht, wurde die cAMP-Bindung von dissoziierten Slugzellen bei einer Substratkonzentration von 0.1 bis 1000 nM cAMP gemessen (siehe Fig. 12). Hs2-slugzellen besitzen 3x soviel niedrigaffine Bindungsstellen, die Dissoziationskonstante bleibt unverändert. Bei den hochaffinen Bindungsstellen kann weder ein Unterschied in der Dissoziationskonstante noch in der Zahl der Rezeptoren nachgewiesen werden.

Da prespore-Zellen generell weniger cAMP binden als prestalk-Zellen (Otte et al 1986), kann der in Hs2 beobachtete Unterschied nicht auf den erhöhten Anteil von prespore-Zellen in Hs2-slugs zurückgeführt werden.

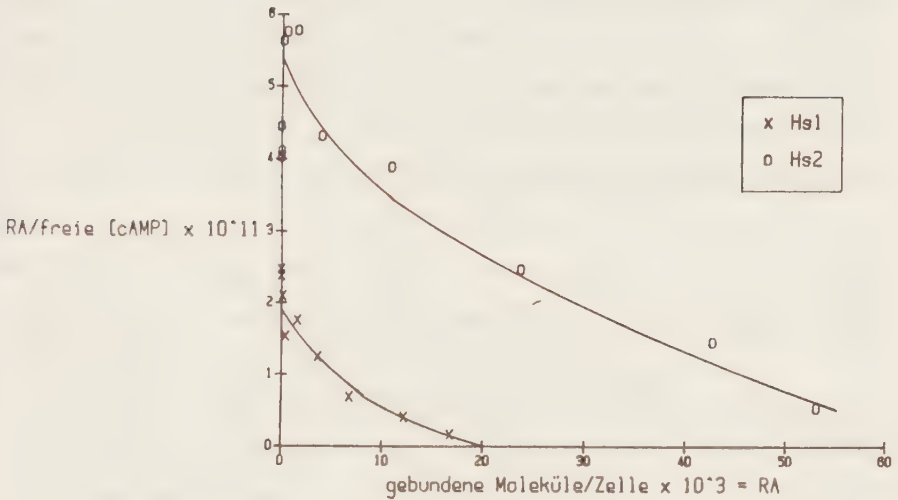


Fig. 12

Scatchardplot der cAMP-Bindungsaktivität von Slugzellen

Hs1- und Hs2-slugs wurden mit einem Pinsel von der Agar-oberfläche abgeschabt, durch ein Nylontuch filtriert, mehrmals gewaschen und dann cellulasezerlegt. Die dissoziierten Slugzellen wurden auf 2×10^8 /ml konzentriert, mit 0.1 bis 1000 nM cAMP inkubiert und ihre cAMP-Bindungsaktivität bestimmt. Jeder Punkt repräsentiert den Mittelwert aus 4 (Hs1) bzw. 3 (Hs2) unabhängigen Experimenten.

Die durchgezogene Linie ist die Kurve, die unter der Annahme, daß 2 Typen von Bindungsstellen vorliegen, berechnet wurde. Die zu dieser Berechnung benötigten Variablen K_d und R_o wurden, wie im Text erläutert, ermittelt und lauten:

Hs1: $K_{d1} = 271 \text{ nM}$ / $R_{o1} = 2 \times 10^4$ Bindungsstellen/Zelle
 $K_{d2} = 24 \text{ nM}$ / $R_{o2} = 3 \times 10^3$ Bindungsstellen/Zelle

Hs2: $K_{d1} = 183 \text{ nM}$ / $R_{o1} = 6 \times 10^4$ Bindungsstellen/Zelle
 $K_{d2} = 14 \text{ nM}$ / $R_{o2} = 2.8 \times 10^3$ Bindungsstellen/Zelle

5.4. Einfluß der Cellulasebehandlung auf die cAMP-Bindung

Multizelluläre Gebilde müssen in Einzelzellen zerlegt werden, um quantitativ cAMP-Bindung messen zu können. Um zu testen, inwiefern diese Enzymbehandlung die Bindungsaktivität beeinflusst, wurden Slugs verschieden lang in Cellulase inkubiert und danach ihre cAMP-Bindung gemessen.

Die Ergebnisse sind in Tab. 4 dargestellt.

Tab. 4

Substrat- konzentrationen	gebundene Moleküle/Zelle			
	min Cellulasebehandlung			
	10 min	30 min	60 min	unzerlegt
10^{-6} M	7.7×10^3		11.9×10^3	
3×10^{-7} M	9.4×10^3		11.9×10^3	
10^{-7} M	5.9×10^3		8.5×10^3	
3×10^{-8} M	3.4×10^3		4.4×10^3	
10^{-8} M	2.0×10^3	1.9×10^3		0.6×10^3
10^{-9} M	0.2×10^3	0.2×10^3		0.09×10^3

Tab.4

Einfluß der Cellulasebehandlung auf die cAMP-Bindungsaktivität

Hs1- und Hs2-slugs wurden mit einem Pinsel von der Agar-oberfläche abgeschabt, durch ein Nylontuch filtriert, mehrmals gewaschen und in vier Portionen aufgeteilt. Bei einer Portion wurde sofort die cAMP-Bindungsaktivität bestimmt (unzerlegt), die anderen 3 Portionen wurden je 10, 30 oder 60 min in Cellulase inkubiert, bevor ein cAMP-bindungsassay durchgeführt wurde.

Wie anhand dieser Daten ersichtlich wird, hat die Cellulasebehandlung keinerlei Einfluß auf die Bindungsaktivität der Slugzellen.

5.5. Bindungsaktivität nichtaggregierter Zellen

Da Slugs, bevor sie cellulasezerlegt wurden, filtriert und mehrmals gewaschen wurden, ist eine Verunreinigung mit nichtaggregierten Zellen wahrscheinlich sehr gering. Teilweise wurden außerdem die Zelltypproportionen der Slugpräparationen bestimmt, und es ergab sich für Hs2-Zellen ein Anteil von ungefähr 72 % prespore-, und für Hs1-Zellen von 80 % prespore-Zellen. Der geringere Anteil prespore-Zellen bei Hs2-Zellen ist auf eine stärkere Verunreinigung mit nichtaggregierten Zellen zurückzuführen, da bei Hs2 wesentlich mehr Zellen nicht aggregieren.

Das Filtrat, d.h. die nichtaggregierten Einzelzellen, wurden ebenfalls auf ihre Bindungsaktivität hin überprüft. Bei einer Substratkonzentration im Bereich von 10 - 1000 nM cAMP unterschieden sich die gemessenen Werte nicht vom Nullwert, d.h. nichtaggregierte Zellen zeigen keine nennenswerte cAMP-Bindung (Daten nicht gezeigt). Die erhöhte Bindungsaktivität von Hs2-Slugzellen kann also nicht auf die etwas stärkere Verunreinigung mit nichtaggregierten Zellen zurückgeführt werden. Im Gegenteil, würde man den Anteil nichtaggregierter Zellen mit äußerst geringer Bindungsaktivität innerhalb der "Slugzell"population berücksichtigen, würde dies zu einer noch höheren Bindungsaktivität der Hs2-slugzellen führen.

6. cAMP-gesteuerte Prozesse

Die bisher geschilderten Daten unterstützen die Annahme, daß Hs2 eine Mutante ist, die sensitiver auf cAMP reagieren könnte. Diese Sensitivitätssteigerung könnte durch eine erhöhte Anzahl Rezeptoren zustandekommen. Auf diese Weise sind in Hs2 bei einer gegebenen extrazellulären cAMP-Konzentration mehr Rezeptoren besetzt als bei Hs1.

cAMP spielt nicht nur während der Chemotaxis sondern auch noch später in der Entwicklung eine bedeutende Rolle. Durch die in der Zellmembran lokalisierten cAMP-spezifischen Rezeptoren sind *Dictyostelium*zellen in der Lage, extrazelluläres cAMP wahrzunehmen. Über die Weiterleitung dieser Signale existieren im einzelnen noch große Unklarheiten. Letztendlich führt dies jedoch zu einer Regulation des Musters der Genexpression. Mehrere Arbeitsgruppen haben die Transkriptionsrate verschiedener Gene nach Zugabe von exogenem cAMP untersucht und konnten zeigen, daß exogenes cAMP sowohl stimulierend als auch inhibierend auf die Expression einzelner Gene wirken kann (Williams et al 1980).

Eine Genfamilie, deren Regulation besonders intensiv untersucht wurde, ist die Discoidin-Multigenfamilie. Discoidin ist ein galactosebindendes Protein, das bereits sehr früh in der Entwicklung synthetisiert wird. Sobald die Aggregation abgeschlossen ist, wird kein Discoidin mehr gebildet (Siu et al 1976, Rowekamp et al 1980, Berger and Clark 1983). Durch Zugabe von exogenem cAMP sehr früh in der Entwicklung kann die Synthese der Discoidin-m-RNA verhindert werden (Williams et al 1980). Discoidin gehört also zu der Gruppe von Genen, deren Expression durch cAMP reprimiert wird.

6.1. Verhalten in vivo

6.1.1. Level der Discoidin-I-m-RNA in Hs1 und Hs2

Um die Discoidin-I-Transkription in vivo in Hs1- und Hs2-Zellen zu untersuchen, wurden zu verschiedenen Zeitpunkten der Entwicklung Zellen gesammelt, Gesamt-RNA isoliert, Northernblots erstellt und mit ^{32}P -markiertem Discoidin-I-cDNA-Klon hybridisiert (siehe Fig. 13 - 15).

Bei Hs1-Zellen zeigt sich ein klarer Anstieg und Abfall der Discoidin-I-message innerhalb der frühen Phase der Entwicklung, sowohl bei Filterentwicklung (Fig. 14) als auch bei Entwicklung auf Agar (Fig. 13). Das Maximum der Expression wird bei Entwicklung auf Filtern etwas eher erreicht (nach 3-4 Stunden) als bei Entwicklung auf Agar (6-8 Stunden). In beiden Fällen wird jedoch nach Abschluß der Aggregation, mit Bildung von tips, kaum noch Discoidin I exprimiert.

Bei Hs2-Zellen war erstaunlicherweise zu keinem Zeitpunkt der Entwicklung eine Discoidin-I-spezifische mRNA nachzuweisen, weder bei Entwicklung auf Agarplatten (Fig. 15) noch auf Filtern und auch nicht in suspensionsgehungerten Zellen (Daten von Filter- und Suspensionsentwicklung nicht gezeigt).

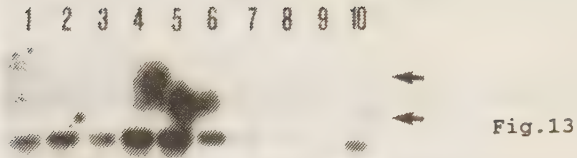


Fig. 13

Kinetik der Discoidin-I-Genexpression in Hs1-Zellen auf Wasseragarplatten

Hungernde Hs1-Zellen wurden auf Wasseragarplatten ausplattiert und bei 22°C inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten der Entwicklung wurde Gesamt-RNA isoliert, 10 µg auf Formaldehydgelen aufgetrennt, auf Nitrocellulose geblottet und mit ^{32}P -markiertem Discoidin-I-cDNA-Klon hybridisiert. Die Pfeile geben die Position der ribosomalen RNA-Banden an.

Spur 1 - 10: Zellen nach
0, 3, 5, 6, 7.5, 9.5, 10, 11, 14, 24 Stunden

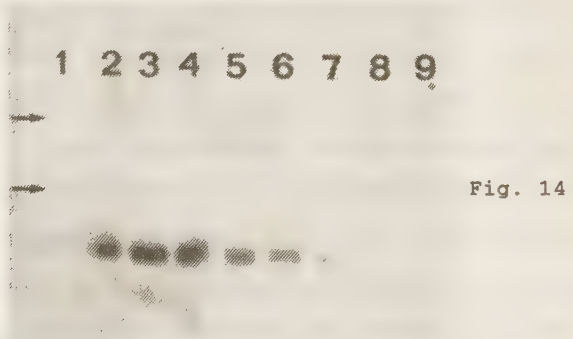


Fig. 14

Fig. 14

Kinetik der Discoidin-I-Genexpression in Hs1-Zellen auf Filtern

Hs1-Zellen wurden zusammen mit Bakterien auf SM/2-Platten gezüchtet. Sobald sie den Bakterienrasen zu lichten begannen, wurden sie abgespült, 3x mit KK_2 -Puffer gewaschen und auf Filterplättchen aufgebracht. Zu verschiedenen Zeitpunkten der Entwicklung wurden die Zellen von den Filtern abgekratzt, und Gesamt-RNA wurde isoliert. 10 µg RNA wurde auf Formaldehydgelen aufgetrennt, auf Nitrocellulose geblottet und mit ^{32}P -markiertem Discoidin I-cDNA-Klon hybridisiert.

Die Pfeile geben die Position der ribosomalen RNA-Banden an.

Spur 1 - 9: Zellen nach
0, 2, 3, 4.5, 5.5, 6.5, 7, 10, 29 Stunden

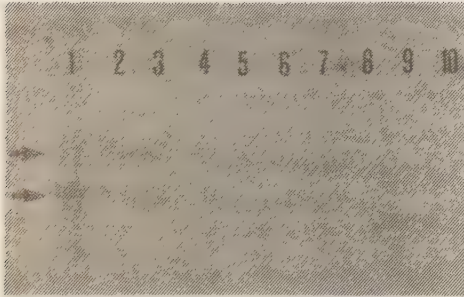


Fig. 15 A

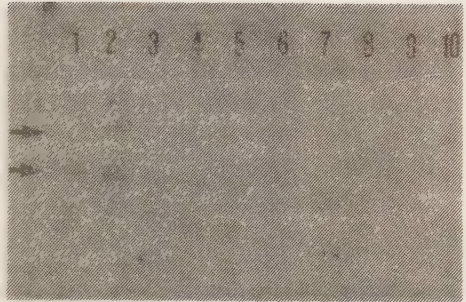


Fig. 15 B

Fig.15

Kinetik der Discoidin-I-Genexpression in Hs2-Zellen auf Wasseragarplatten

Hungernde Hs2-Zellen wurden auf Wasseragarplatten ausplattiert und bei 22°C inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten der Entwicklung wurde Gesamt-RNA isoliert, 10 µg auf Formaldehyd-gelen aufgetrennt, auf Nitrocellulose geblottet und mit ³²P-markiertem Discoidin-I-cDNA-Klon hybridisiert.

Sichtbar ist eine schwache Kreuzhybridisierung mit den ribosomalen RNA-Banden (siehe Pfeile).

A: Spur 1 - 10: Zellen nach 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 Stunden

B: Spur 1 - 10: Zellen nach 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 33, 40 Stunden

6.1.2. Expression des Discoidin-Proteins

Um dieses Ergebnis zu überprüfen, wurde zusätzlich die Expression des Discoidin-Proteins überprüft. Zellextrakte zu verschiedenen Zeitpunkten der Entwicklung wurden auf Polyacrylamidgelen aufgetrennt, auf Nitrocellulose geblottet, und die Discoidin-proteine I + II mit einem polyklonalen Anti-Discoidin-Antikörper nachgewiesen (siehe Fig. 16 + 17). Sowohl die Menge an Discoidin I- als auch an Discoidin II-Protein ist in Hs2 stark vermindert. Eine Quantifizierung durch Ausschneiden und Zählen der radioaktiven Banden im Szintillationszähler ergab eine 8-fache Reduzierung an Discoidin I, und eine 3-fache Reduzierung an Discoidin II.

Die Discoidinproteine sind in allen Stadien der Entwicklung nachzuweisen, da die Proteine sehr stabil sind und im Laufe der Entwicklung kaum abgebaut werden (Bartles et al 1982). Aufgrund von Pulsmarkierungen ist allerdings bekannt, daß Discoidin-Proteine nur in den ersten 8 Stunden der Entwicklung synthetisiert werden (Alexander and Shinnick 1985).

Die Diskrepanz zwischen Northern- (keine mRNA vorhanden) und Westernblots (20 % des Wildtyplevels an Protein) bei Hs2 beruht entweder auf der höheren Sensitivität der Antikörperbindung, erleichtert auch dadurch, daß das Protein kaum abgebaut wird, oder sie kommt aufgrund einer sehr instabilen mRNA zustande (siehe Diskussion).

Discoidin-mRNA und -Protein ist also in Hs2 nur in sehr geringem Maße vorhanden. Um abzuklären, inwiefern es sich dabei um einen generellen Defekt der frühen Entwicklung handelt, wurden noch andere Marker der Frühentwicklung untersucht.

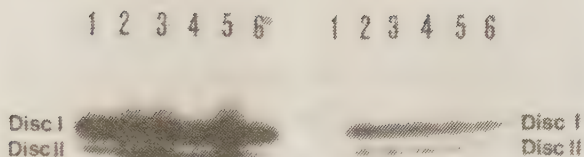


Fig. 16

Fig. 17

Fig. 16 und 17

Discoidin-Protein in Hs1- und Hs2-Zellen

Hs1- (Fig. 16) und Hs2-Zellen (Fig. 17) wurden auf Wasseragarplatten ausplattiert, bei 22°C inkubiert, und zu verschiedenen Zeitpunkten Zellen abgespült, pelletiert und bei -80°C eingefroren. Die aufgetauten Zell-lysate wurden in Lämmli-puffer aufgenommen, je 25 µg auf Polyacrylamidgelen aufgetragen und anschließend auf Nitrocellulose geblottet. Die Westernblots wurden mit einem polyklonalen Anti-discoidin-Antikörper und einem zweiten, ¹⁴²-Jod-markiertem Ziegen-anti-Kaninchen-Antikörper, inkubiert. Der Discoidinantikörper erkennt sowohl Discoidin-I, als auch Discoidin-II-protein.

Fig. 16: Hs1-Zellen
 Spur 1 - 6: Zellen nach 0, 4, 7, 11, 20, 24 Stunden

Fig. 17: Hs2-Zellen
 Spur 1 - 6: Zellen nach 0, 8, 16, 20, 24, 33 Stunden

6.1.3. Vergleich der Frühentwicklung von Hs1 und Hs2

a. α -Mannosidase

α -Mannosidase ist ein Enzym, dessen Aktivität unmittelbar nach Einsetzen der Differenzierung meßbar wird und in den folgenden Stunden der Entwicklung immer mehr ansteigt (Loomis 1970). Hs1- und Hs2-Zellen wurden auf Wasseragarplatten ausplattiert, bei 22°C inkubiert und stündlich die α -Mannosidaseaktivität gemessen (siehe Fig. 18). Hs2 unterscheidet sich nicht von Hs1, wenngleich auch die Aktivität etwas langsamer zunimmt, was vermutlich mit der längeren Preaggregationsphase in Zusammenhang steht.

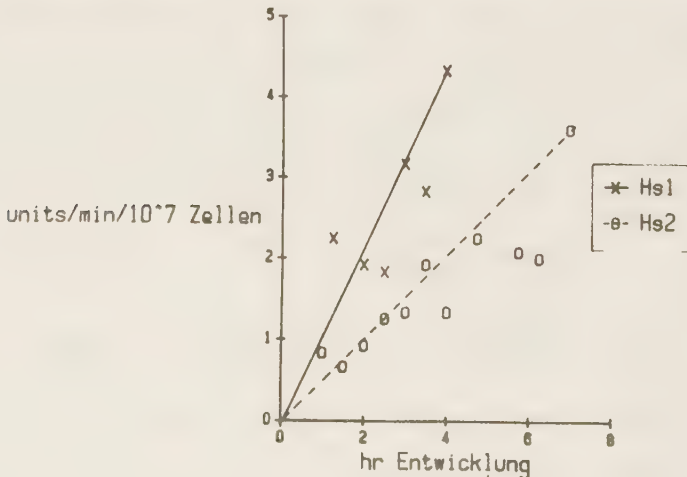


Fig. 18

Entwicklungsregulierte Aktivität der α -Mannosidase

Hs1- und Hs2-Zellen wurden auf Wasseragarplatten ausplattiert, bei 22°C inkubiert, zu verschiedenen Zeitpunkten Zellen abgespült, pelletiert und bei -80°C eingefroren. Mit den aufgetauten Zell-lysaten wurde ein α -Mannosidase-assay (siehe Material und Methoden) durchgeführt.

b. Expression der frühen Gene I42 und M3

I42 und M3-cDNA-Klone wurden zusammen mit dem Discoidin-I-cDNA-Klon isoliert (Rowekamp and Firtel 1980) und gehören zur Gruppe der Gene, die sehr früh in der Entwicklung, während der Preaggregationsphase, transkribiert werden.

In Fig. 19 - 22 ist gezeigt, daß sowohl I42 als auch M3 in Hs2 (ebenso wie in Hs1) exprimiert werden. Die verminderte Expression der Discoidingene in Hs2 beruht aller Wahrscheinlichkeit also nicht darauf, daß ein Teil der frühen Entwicklung ausfällt oder umgangen wird.

6.1.4. Struktur der Discoidingene

Die Struktur der Discoidingene in Hs1 und Hs2 wurde durch Southernblotanalyse untersucht. Die DNA der beiden Stämme wurde isoliert, mit EcoRI und Hind III geschnitten, auf Agarosegelen aufgetrennt, auf Nitrocellulose geblottet, und mit ^{32}P -markiertem Discoidin I-spezifischen cDNA-Klon hybridisiert. Beide Restriktionsenzyme produzierten die erwarteten Banden (Poole et al 1981, Rowekamp et al 1980), (siehe Fig. 23 und 24). Auffallende Veränderungen der Discoidingene, wie z.B. größere Deletionen oder Rearrangements, können somit ausgeschlossen werden. Punktmutationen außerhalb der Erkennungssequenzen der verwendeten Enzyme führen selbstverständlich zu keiner Veränderung des Restriktionsmusters.

Hs1

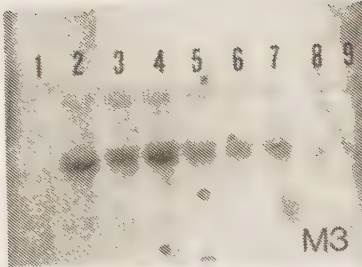


Fig. 19

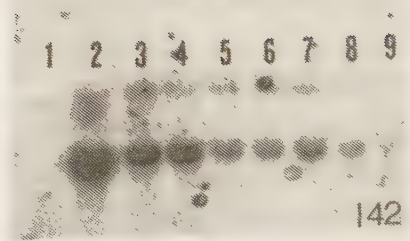


Fig. 20

Hs2

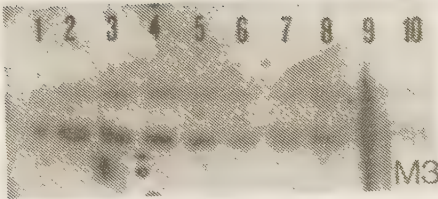


Fig. 21

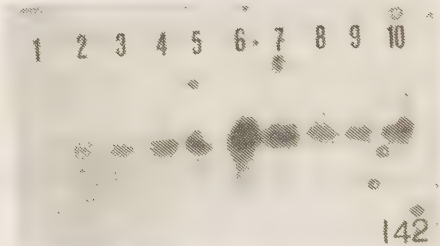


Fig. 22

Fig. 19 - 22

Kinetik der M3- und I42-Genexpression in Hs1- und Hs2-Zellen

Hs1- (Fig. 19 + 20) und Hs2-Zellen (Fig. 21 + 22) wurden auf Wasseragarplatten ausplattiert und bei 22°C inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten der Entwicklung wurde Gesamt-RNA isoliert, 10 µg auf Formaldehydgelen aufgetrennt, auf Nitrocellulose geblottet und mit ^{32}P -markiertem M3-cDNA-Klon (Fig. 19 + 21) und I42-cDNA-Klon (Fig. 20 + 22) hybridisiert.

Fig. 19 + 20: Hs1-Zellen
 Spur 1 - 9: Zellen nach
 0, 3, 6, 7.5, 9.5, 10, 11, 14, 24 Stunden

Fig. 21: Hs2-Zellen
 Spur 1 - 10: Zellen nach
 8, 10, 12, 13, 15, 17, 18, 20, 24, 33 Stunden

Fig. 22: Hs2-Zellen
 Spur 1 - 10: Zellen nach
 0, 5, 8, 12, 14, 18, 20, 24, 30, 33 Stunden

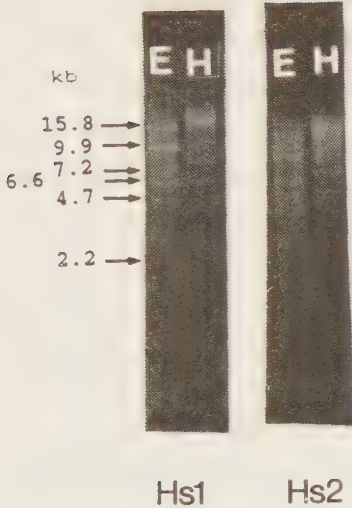


Fig. 23

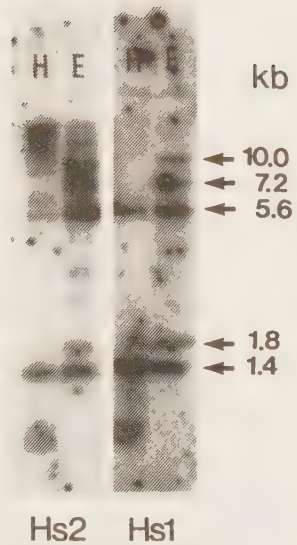


Fig. 24

Fig. 23 + 24

Restriktionsanalyse des Discoidin I-Gens

Hs1- und Hs2-Kern-DNA wurde isoliert, mit Eco RI oder Hind III geschnitten und auf Agarosegelen aufgetrennt.

Fig. 23

Ethidiumbromidgefärbtes Gel von Eco RI- und Hind III-Restriktionsfragmenten.

Die Banden representieren die rDNA, die für die 18 S und 28 S rRNA codiert (120 Kopien/Genom) und dienten als Molekulargewichtsmarker (Firtel et al 1976).

Fig. 24

Southernblot hybridisiert mit ^{32}P -markiertem Discoidin I-c-DNA-Klon

E = Eco RI

H = Hind III

6.1.5. Expression später Gene in vivo

Wie bereits erwähnt, kann durch Zugabe von extrazellulärem cAMP zu Beginn der Differenzierung, eine Akkumulierung der Discoidin I-m-RNA in Wildtypzellen verhindert werden (Williams et al 1980). Gleichzeitig werden bei solchermaßen behandelten Zellen spätere Gene frühzeitig exprimiert (Williams et al 1980). Unter diesem Aspekt betrachtet, erschien es interessant, das zeitliche Muster der Expression später Gene in Wildtyp und Mutante zu verfolgen. Drei Marker wurden ausgewählt, D11 und PL3, zwei cDNA-Klone, und MUD1, ein prespore-spezifischer Antikörper.

a. D11- und PL3-Expression

D11 und PL3 representieren sog. späte, zelltypspezifische Gene (Barklis and Lodish 1983). In NC4-Zellen taucht PL3-Expression erst nach etwa 15 Stunden Entwicklung (Slugstadium) auf und ist auf prespore-Zellen beschränkt. D11-Expression beginnt schon ab 7 Stunden und erreicht ihr Maximum während des tipstadiums (Oyama and Blumberg 1986b). Im Slugstadium wird D11 dann nur noch in prestalk-Zellen exprimiert.

Hs1- und Hs2-Zellen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten ihrer Entwicklung gesammelt und auf ihre Transkripte hin untersucht (siehe Fig. 24 + 25 und 26 + 27). Der Höhepunkt der PL3- und D11- Expression findet bei Hs1 und Hs2, absolut betrachtet, etwa zur gleichen Zeit statt, in Relation zu distinkten morphologischen Stadien, wie z.B. tipbildung, ist jedoch eine deutliche Verschiebung sichtbar. So wird in Hs1 PL3 am stärksten 3-4 Stunden nach der tipbildung exprimiert, das Maximum der D11-

Expression fällt mit der Ausbildung von tips zusammen. Bei Hs2 hingegen erfolgt die D11-Expression bereits während der Aggregation, 4-5 Stunden vor der tipbildung, ebenso wird PL3 während der Aggregation, noch vor Bildung von tips, exprimiert. Interessanterweise ist jedoch die zeitliche Beziehung zwischen D11- und PL3- Expression untereinander unverändert geblieben. Der Höhepunkt der D11- und PL3-Expression liegt in beiden Stämmen etwa 4 Stunden auseinander.

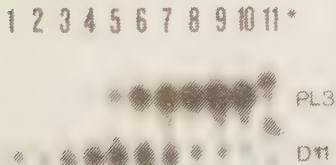


Fig. 25

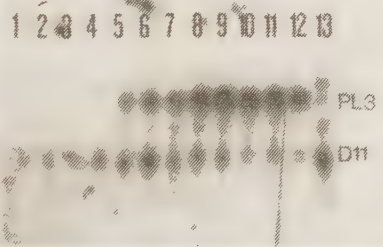


Fig. 26

Fig. 25 + 26

Zeitliche Kinetik der PL3- und D11-Genexpression in Hs1- und Hs2-Zellen

Hs1- (Fig. 25) und Hs2-Zellen (Fig. 26) wurden auf Salzplatten ausplattiert, 12 Stunden bei 4°C inkubiert, dann in 22°C transferiert, und zu verschiedenen Zeitpunkten RNA aus den Zellen isoliert. 10 µg RNA wurde auf Formaldehydgelen aufgetrennt, auf Nitrocellulose geblottet und mit ³²P-markierten PL3- und D11-c-DNA-Klonen hybridisiert.

Fig. 25:

Hs1-Zellen, die 12 Stunden bei 4°C und folgende Zeiten bei 22°C inkubiert wurden: 0, 1, 2.5, 3.5, 4.5, 5, 7, 9, 12, 13, 42

Fig. 26:

Hs2-Zellen, die 12 Stunden bei 4°C und folgende Zeiten bei 22°C inkubiert wurden: 0, 0.5, 1.5, 3, 4, 5, 6, 7, 8.5, 9.5, 10.5, 27, 48

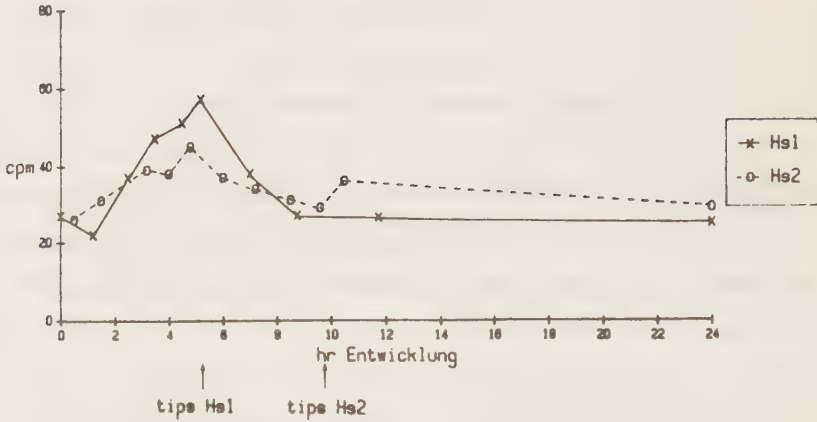


Fig. 27

D11-m-RNA-Level in Hs1- und Hs2-Zellen

Die D11-Banden des blots aus Fig. 25 und Fig. 26 wurden ausgeschnitten und im Szintillationszähler gezählt.

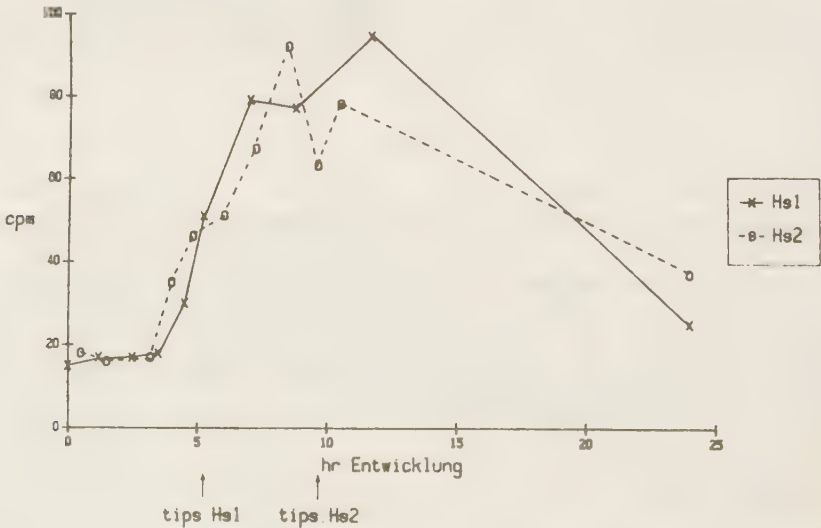


Fig 28

PL3-m-RNA-Level in Hs1- und Hs2-Zellen

Die PL3-Banden des blots aus Fig. 25 und Fig. 26 wurden ausgeschnitten und im Szintillationszähler gezählt.

b. MUD1-Expression

MUD1 ist ein Antikörper gegen ein Zellmembranprotein von prespore-Zellen und taucht erstmals nach Bildung von Slugs auf. Zellproben wurden zu verschiedenen Zeitpunkten der Entwicklung entnommen, fixiert und mit MUD1-Antikörper inkubiert (Fig. 28). In Hs1-Zellen wird MUD1, wie erwartet, erst nach tipbildung, wenn sich die ersten Slugstrukturen bilden, exprimiert. In Hs2-Zellen ist MUD1 jedoch schon früher, noch vor tipbildung, nachzuweisen.

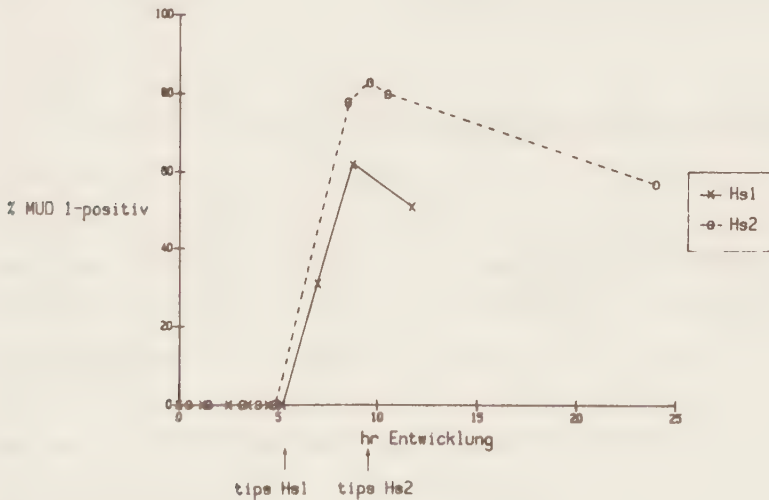


Fig 29

MUD1-Antigen-Expression in Hs1- und Hs2-Zellen

Hs1- und Hs2-Zellen wurden auf Salzplatten ausplattiert, 12 Stunden bei 4°C inkubiert und dann in 22°C transferiert. Dies gilt als Zeitpunkt 0. Zu verschiedenen Zeitpunkten der Entwicklung wurden Zellen fixiert und mit MUD1 und einem zweiten, fluoreszenz-markierten Ziegen-anti-Maus-Antikörper inkubiert. Der Anteil MUD1-positiver Zellen wurde mithilfe eines Fluoreszenzmikroskops bestimmt.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß sich Hs1-Zellen, in bezug auf die Expression von D11, PL3 und MUD1, wie die in der Literatur beschriebenen NC4-Zellen verhalten.

In Hs2-Zellen konnte, in vergleichbaren morphologischen Stadien, bei allen drei Markern ein verfrühtes Auftreten beobachtet werden.

In beiden Aspekten, Unterdrückung der Discoidinakkumulation und frühzeitige Expression verschiedener später Gene, verhält sich Hs2 in vivo so wie NC4-Zellen, die früh in der Entwicklung exogenem cAMP ausgesetzt wurden (Williams et al 1980).

6.2. Induktion später Gene in vitro

Bisher wurden mehrere Systeme beschrieben, in denen in vitro die Transkription verschiedener Gene durch Zugabe von hohen Konzentrationen an exogenem cAMP induziert werden kann (Mehdy et al 1983, Schaap and van Driel 1985, Oyama et al 1986a, Haribabu and Dottin 1986). Diese Geninduktion bietet ein System, mit dem man "Sensitivitätsänderungen" quantifizieren könnte, da das Ausmaß der induzierten m-RNA-Akkumulation von der Konzentration des zugegebenen cAMPs abhängig ist (Oyama et al 1986a, Haribabu and Dottin 1986).

Um quantitative Aussagen machen zu können, muß jedoch ein Abbau des zugegebenen cAMPs durch die Phosphodiesterase der *Dictyostelium*zellen vermieden werden. Dies kann entweder durch Verwendung eines nicht zu hydrolisierenden cAMP-Analogs erreicht werden (Haribabu and Dottin 1986), oder die Phosphodiesterase kann mit einem anderen Substrat (das selbst keine Wirkung auf

Induktion von Genen zeigt) abgesättigt werden (Oyama and Blumberg 1986a).

Aufgrund der Annahme, Hs2 reagiere sensitiver auf cAMP, würde man erwarten, daß Genexpression in Hs2-Zellen durch geringere cAMP-Konzentrationen induziert werden kann als in Hs1.

Diese Vorhersage zu testen war mein nächstes Ziel.

6.2.1. Induktion später Gene in aggregationskompetenten Zellen

Als aggregationskompetent werden Zellen bezeichnet, die bereits cAMP-Rezeptoren und andere Komponenten des cAMP-Signalsystems besitzen aber noch nicht aggregiert haben. Sie können auf zweierlei Art und Weise erzeugt werden. Entweder man entfernt die Zellen aus ihrem Wachstumsmedium, resuspendiert sie in Puffer, und läßt sie etwa 6 Stunden lang unter ständigem Schütteln hungern (Haribabu and Dottin 1986, Oyama et al 1986a, Mehdy et al 1983), oder die Zellen werden auf nährstofflosen Agar ausplattiert und 12 Stunden bei 4°C inkubiert (Schaap and van Driel 1985).

a. Induktion später Gene in suspensionsgehungerten Zellen

Aggregationskompetente Zellen, die durch 6 Stunden hungern in Suspension entstanden sind, wurden 14 Stunden lang mit verschiedenen Konzentrationen an cAMP schnell geschüttelt (200 rpm) und danach auf die Anwesenheit prestalk- und prespore-spezifischer Transkripte hin untersucht.

Weder in Hs1 noch in Hs2 konnte auf diese Weise ein prespore-spezifisches Gen induziert werden. D11-Expression (prestalk-spezifisch) konnte in Hs2-, jedoch nicht in Hs1- Zellen induziert werden. D11 wird bei Hs2 ab 5 μ M cAMP induziert, bei sehr hohen cAMP-Konzentrationen (100 μ M) scheint die Expression leicht inhibiert zu sein (siehe Fig. 30 und 31).



Fig. 30 A

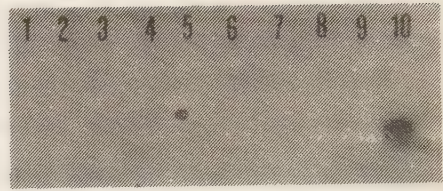


Fig. 30 B

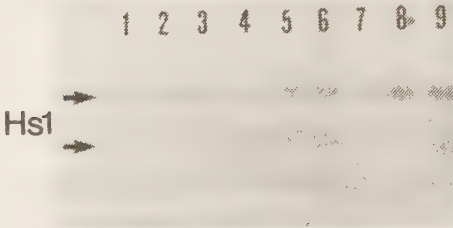


Fig. 31 A

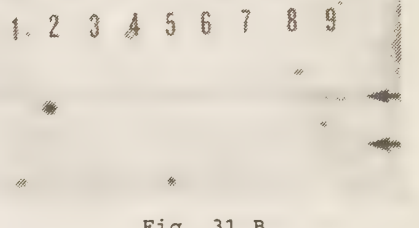


Fig. 31 B

Fig 30 + 31

Effekt von cAMP auf die Induktion prestalk- und prespore-spezifischer Gene in suspensionsgehangerten Hs1- und Hs2-Zellen

Hs1-Zellen (Fig. 31) und Hs2-Zellen (Fig. 30) werden bei einer Konzentration von 5×10^6 /ml vom Bakterienmedium durch dreimaliges Waschen befreit, in einer Konzentration von 1×10^7 /ml in MES-PDF-Puffer resuspendiert und 6 Stunden geschüttelt. Danach wird cAMP in verschiedenen Konzentrationen und Dibutyryl-cAMP (500 μ M) als Phospho-diesterase-Kompetitor zugegeben und erneut 14 Stunden lang bei 200 rpm geschüttelt. Gesamt-RNA wurde isoliert, 10 μ g auf Formaldehyd-Gelen aufgetrennt, auf Nitrocellulose geblottet, und mit 32 P-markierten prespore-spezifischen (EB4, D19, PL3) und prestalk-spezifischen Klonen (D11) hybridisiert.

- Spur 1: geschüttelt ohne Dibutyryl-cAMP und ohne cAMP
 Spur 2: geschüttelt nur mit Dibutyryl-cAMP
 Spur 3-9: geschüttelt mit Dibutyryl-cAMP und cAMP in folgenden Konzentrationen: 0.1, 1, 5, 10, 30, 50, 100 μ M
 Spur 10: RNA aus Hs1-slugs als Kontrolle

Fig. 30 A = hybridisiert mit D11

Fig. 30 B = hybridisiert mit D19

(Hybridisierungen mit EB4 und PL3 zeigen das gleiche Ergebnis, nicht gezeigt)

Anmerkung: in Spur 5 wurde mehr als 10 μ g RNA aufgetragen.

Fig. 31 A = hybridisiert mit D11

Fig. 31 B = hybridisiert mit PL3

(Hybridisierungen mit EB4 und D19 zeigen das gleiche Ergebnis, nicht gezeigt)

Die Pfeile geben die Positionen der ribosomalen RNA-Banden an.

b. Induktion später Gene bei agar-gehungerten Zellen

Zellen, die bei 4°C inkubiert werden, befinden sich nach 12 Stunden im sog. ripple-Stadium, d.h. der Zellrasen ist leicht gewellt, die Zellen haben jedoch noch nicht aggregiert. Werden die Zellen dann nach 22°C transferiert, beginnen Hs1-Zellen sofort zu aggregieren, Hs2-Zellen erst nach einigen Stunden.

Auf diese Weise gewonnene aggregationskompetente Zellen wurden 18 Stunden lang mit verschiedenen cAMP-Konzentrationen schnell (250 rpm) geschüttelt.

Mit dieser Behandlung kann in Hs1-Zellen PL3-Transkription nicht induziert werden (Fig. 33). In Hs2-Zellen hingegen wird, in Gegenwart sehr hoher cAMP-Konzentrationen ($\geq 50 \mu\text{M}$), das PL3-Gen exprimiert (Fig. 32).

D11 wird sowohl in Hs1 als auch in Hs2 zu Beginn des Experiments schwach exprimiert, ist jedoch nach 18-stündigem Schütteln verschwunden. In Hs1-Zellen kann dieses Verschwinden nur mit sehr hohen cAMP-Konzentrationen (50 - 100 μM) verhindert werden, bei Hs2 genügen bereits 5 μM .

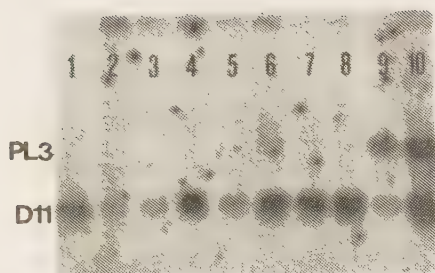


Fig. 32

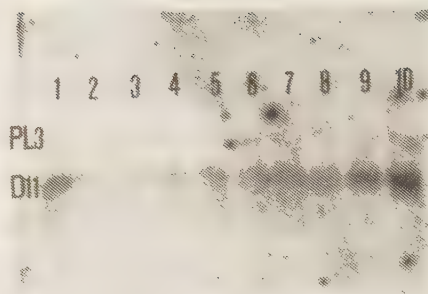


Fig. 33

Fig. 32 und 33

Effekt von cAMP auf die Induktion prestalk- und prespore-spezifischer Gene in auf Agar gehungerten Hs1- und Hs2-Zellen

Hs1-Zellen (Fig. 33) und Hs2-Zellen (Fig. 32) wurden auf nährstofflosen Wasseragar ausplattiert und 12 Stunden bei 4°C inkubiert. Danach wurden sie sofort geerntet, in MES/PDF-Puffer + 1mM EDTA resuspendiert (5×10^6 /ml) und 18 Stunden bei 250 rpm mit oder ohne cAMP geschüttelt.

Gesamt-RNA (10 µg) wurde auf Formaldehydgelen aufgetrennt, auf Nitrocellulose geblottet und mit 32 P-markierten PL3- (prespore-spezifisch) und D11- (prestalk-spezifisch) cDNA-Klonen hybridisiert.

- Spur 1: Zellen zu Beginn des Experiments
- Spur 2: geschüttelt ohne Dibutyryl-cAMP und ohne cAMP
- Spur 3: geschüttelt nur mit Dibutyryl-cAMP
- Spur 4-10: geschüttelt mit Dibutyryl-cAMP und cAMP in folgenden Konzentrationen: 0.2, 1, 5, 10, 30, 50, 100 µM

Anmerkung: In Fig. 32, Spur 9 wurde weniger als 10 µg RNA aufgetragen.

Fig. 32: Hs2-Zellen

Fig. 33: Hs1-Zellen

Im gleichen Versuch wurde außerdem die Expression von MUD1, einem prespore-spezifischen Antigen überprüft. Dazu wurden Zellen formaldehydfixiert, mit MUD1 und einem FITC-gekoppelten zweiten Antikörper inkubiert und der Anteil fluoreszenter Zellen mithilfe eines Fluoreszenzmikroskops ausgezählt (siehe Fig. 34).

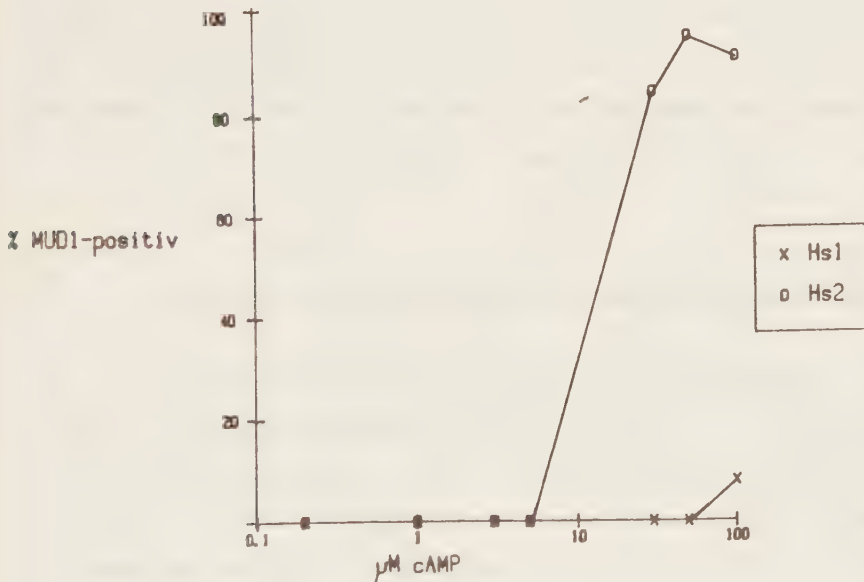


Fig. 34

Effekt von cAMP auf MUD1-Antigenexpression

Versuchsbeschreibung siehe Fig. 32 und 33

Nach Beendigung des Versuchs wurde ein Teil der Zellen formaldehydfixiert und mit MUD1-Antikörper und einem zweiten FITC-konjugierten Ziegen-anti-Maus Antikörper inkubiert.

Der Anteil MUD1-positiver Zellen wurde mithilfe eines Fluoreszenzmikroskops ausgezählt.

Übereinstimmend mit den Ergebnissen, die aufgrund der RNA-Analysen gewonnen wurden, wird auch das MUD1-Antigen in Hs1-Zellen, nach Stimulation mit cAMP, nicht exprimiert. Nur eine äußerst schwache Färbung bei etwa 8 % der Zellen konnte nach Schütteln mit 100 μ M cAMP festgestellt werden.

In Hs2 exprimieren bereits ab einer cAMP-Konzentration von 30 μ M etwa 80 % der Zellen das prespore-Antigen. Dieser Anteil kann durch Erhöhung auf 100 μ M cAMP kaum noch gesteigert werden.

Da es keine Antikörper gibt um prestalk-, anterior-like-Zellen und undifferenzierte Amöben voneinander zu unterscheiden, kann die Frage, um welchen Zelltyp es sich bei den 20 % prespore-negativen Zellen handelt, leider nicht beantwortet werden.

6.2.2. Induktion später Gene bei aggregierenden Zellen

Hs1- und Hs2-Zellen wurden auf Salzplatten ausplattiert, 12 Stunden bei 4°C inkubiert, dann in 22°C transferiert, und Hs1-Zellen nach 2 Stunden, Hs2-Zellen nach 7 Stunden geerntet. Beide Stämme befanden sich, nach morphologischen Kriterien beurteilt, etwa im selben Stadium, d.h. auf dem Höhepunkt der Aggregation: deutlich ausgeprägte Aggregationszentren, viele Aggregationsströme, kaum Einzelzellen dazwischen.

Hs1-Zellen exprimieren bereits D11 in diesem Stadium, jedoch noch nicht PL3. D11-Transkripte verschwinden nach 4 Stunden Schütteln. Befindet sich jedoch cAMP in einer Konzentration von ≥ 3 μ M im Medium, kann der Verlust der D11-Transkripte verhindert werden. Bei einer cAMP-Konzentration von ≥ 50 μ M ist jedoch wieder ein teilweiser Verlust der D11-Transkripte zu beobachten (siehe Fig. 35).

PL3-Transkripte in Hs1 werden ab einer cAMP-Konzentration von 3 μM induziert. Mit zunehmender cAMP-Konzentration steigt das Ausmaß der Induktion (siehe Fig. 35).

Bei Hs2-Zellen kann von keiner Induktion gesprochen werden, da die Zellen D11 und PL3 bereits bei Beginn des Experiments exprimieren. D11 verschwindet, im Gegensatz zu Hs1, auch nicht durch Schütteln, ebensowenig PL3 (siehe Fig. 36).

Die Expression des MUD1-Antigens ist in Fig. 37 gezeigt. MUD1 wird in Hs1-Zellen ab einer cAMP-Konzentration von 5 μM exprimiert. MUD1 wird in Hs2-Zellen, im Gegensatz zu PL3, nach 7 Stunden noch nicht exprimiert, wird jedoch bereits durch Schütteln mit Dibutyryl-cAMP induziert. Zugabe von cAMP verstärkt die Expression, wobei bereits bei einer Konzentration von 0.2 μM maximale Expression erfolgt. Schütteln alleine ist nicht der auslösende Faktor für die MUD1-Expression, da im Kontrollversuch (Schütteln ohne Dibutyryl-cAMP und ohne cAMP) kein MUD1-Antigen exprimiert wird.

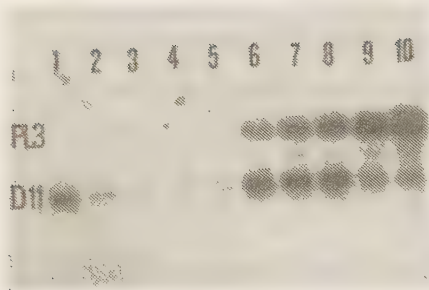


Fig. 35



Fig. 36 A

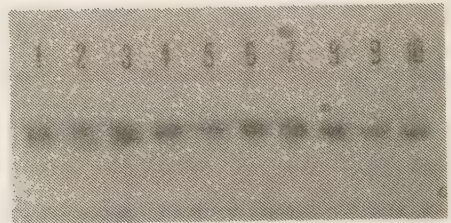


Fig. 36 B

Fig. 35 und 36

Effekt von cAMP auf die Induktion prestalk- und prespore-spezifischer Gene in aggregierenden Hs1- und Hs2-Zellen

Hs1- (Fig. 35) und Hs2-Zellen (Fig. 36) wurden auf Wasser-agarplatten ausplattiert und 12 Stunden bei 4° inkubiert. Danach wurden sie in 22°C transferiert, und Hs1-Zellen nach 2, Hs2-Zellen nach 7 Stunden geerntet.

Die Zellen wurden anschließend in MES/PDF-Puffer (1×10^7 /ml) aufgenommen und 4 Stunden bei 100 rpm geschüttelt.

Gesamt-RNA (10 µg) wurde auf Formaldehydgelen aufgetrennt, auf Nitrocellulose geblottet und mit 32 P-markierten PL3- (prespore-spezifisch) und D11- (prestalk-spezifisch) cDNA-Klonen hybridisiert.

- Spur 1: Zellen zu Beginn des Experiments
 Spur 2: geschüttelt ohne Dibutyryl-cAMP und ohne cAMP
 Spur 3: geschüttelt nur mit Dibutyryl-cAMP
 Spur 4-10: geschüttelt mit Dibutyryl-cAMP und cAMP in folgenden Konzentrationen: 0.2, 1, 3, 5, 10, 50, 100 µM

Fig. 35: Hs1-Zellen, hybridisiert mit PL3 und D11

Fig. 36A: Hs2-Zellen, hybridisiert mit PL3

Fig. 36B: Hs2-Zellen, hybridisiert mit D11

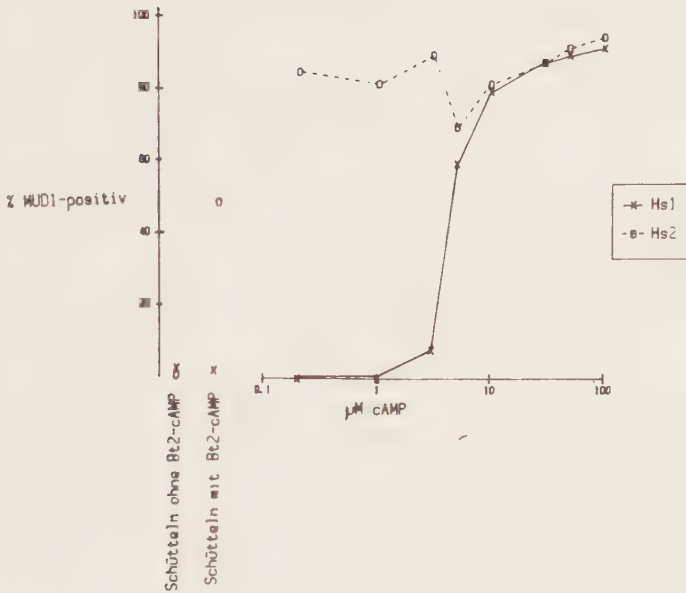


Fig. 37:

Effekt von cAMP auf MUD1-Antigenexpression

Versuchsbeschreibung siehe Fig. 35 und Fig. 36.

Nach Beendigung des Versuchs wurde ein Teil der Zellen formaldehydfixiert und mit MUD1-Antikörper und einem zweiten FITC-konjugierten Ziegen-anti-Maus Antikörper inkubiert. Der Anteil MUD1-positiver Zellen wurde mithilfe eines Fluoreszenzmikroskops ausgezählt.

Bt2-cAMP = Dibutyryl-cAMP

6.2.3 . Zeitlicher Verlauf der Induzierbarkeit

Die Induzierbarkeit später Gene ist abhängig vom Alter der Zellen. Je näher sich die Zellen in ihrem Entwicklungsstatus dem Stadium befinden, in dem sie auch in vivo ein Gen exprimieren würden, desto eher können sie auch durch cAMP-Gaben stimuliert werden und das Gen frühzeitig exprimieren.

Studien von Hs1 und Hs2 werden durch die unterschiedlich lange Aggregationsphase erheblich erschwert. Vergleichbare Stadien, wie "aggregationskompetent" oder "aggregierend", können in ihrem Muster der Genexpression durchaus unterschiedlich sein. Wie bereits gezeigt wurde, sind z.B. aggregierende Hs2-Zellen bezüglich der Expression von PL3 schon weiter in der Entwicklung fortgeschritten als Hs1 (siehe Fig. 28 und Fig. 36).

Das unterschiedliche Verhalten von Hs1 und Hs2 bezüglich Genexpression nach cAMP-Zugabe muß daher nicht unbedingt auf einer Sensitivitätsänderung beruhen, sondern könnte auch darauf zurückgeführt werden, daß Hs2 bezüglich der relevanten Marker schon weiter entwickelt ist als Hs1, und deshalb bestimmte Gene leichter induzierbar sind.

Deshalb ist es äußerst problematisch Hs1- und Hs2-Entwicklungsstadien, die aufgrund morphologischer (z.B. Aggregationsströme) oder zeitlicher (z.B. 12 Stunden Inkubation bei 4°C) Kriterien ausgewählt wurden, zu vergleichen.

Um nun einen Zeitabschnitt in der Entwicklung einzugrenzen in dem Hs1 und Hs2 vergleichbar sind, wurden Hs1- und Hs2-Zellen in verschiedenen Entwicklungsstadien geerntet und auf die Expression mehrerer Marker hin untersucht. Die einzelnen Stadien wurden dann mit cAMP stimuliert, um PL3- und D11-Expression zu induzieren (siehe Fig. 38 und 39).

a. PL3 wird in Hs1 ab t3 (5 Stunden) exprimiert (Fig. 38a/t3, Spur 1), in Hs2 wird PL3 auch nach 6 Stunden (Fig. 39a/t4, Spur 1) noch nicht exprimiert. Vergleichbar in dieser Entwicklungsreihe sind t1 und t2 in Hs1 und t1 - t4 in Hs2, d.h. Stadien, in denen PL3 noch nicht exprimiert wird.

b. D11-Expression in Hs1 ist vorhanden nach 1 Stunde (Fig. 38b/t1, Spur 1), in Hs2 nach 6 Stunden (Fig. 39b/t4, Spur 1). Mithilfe dieses Markers läßt sich die Zeitspanne noch weiter eingrenzen, und man kann daraus schließen, daß das Stadium t1 in Hs1 dem Stadium t4 in Hs2 entspricht.

c. Als ein weiterer Marker, um vergleichbare Hs1- und Hs2-Stadien einander zuzuordnen, wurde I42, ein frühes Gen, benutzt. I42 wird bei Hs1 bereits nach 1 Stunde sehr stark exprimiert, nach 2.5 Stunden ist die Expression bereits im Abnehmen begriffen, und nach 5 Stunden wird kein I42 mehr exprimiert (Fig. 38c/t1-t3, Spur 1).

In Hs2 taucht I42 schwach nach 2.5 und 4.5 Stunden auf, stark wird es nach 6 Stunden exprimiert (Fig. 39c/t2-t4, Spur 1). Die Expressionsstärke von t1 in Hs1 und t4 in Hs2 ist in etwa vergleichbar.

Aufgrund des Verhaltens dieser drei Marker (PL3, D11, I42) kann argumentiert werden, daß in diesem Versuch das Stadium t1 von Hs1 dem Stadium t4 von Hs2 vergleichbar ist.

In diesen Stadien wird PL3 bei Hs2 ab 5 μM cAMP (Fig. 39a/t4, Spur 5), bei Hs1 erst ab 20 μM cAMP (Fig. 38a/t1, Spur 6) induziert.

Die Regulation von D11 nach cAMP-Zugabe ist komplexer als die von PL3. cAMP wirkt zwar ebenfalls induzierend oder stabilisierend auf die Expression von D11, sehr hohe Konzentrationen an cAMP wirken jedoch inhibierend (Fig. 39b/t3, Spur 7, Fig. 39b/t4, Spur 6-7, und Fig. 38b/t1 und t2, Spur 7). Bei Hs1 (t1) werden nach Zugabe von 100 μM cAMP weniger D11-Transkripte produziert als nach Zugabe von nur 20 μM cAMP (Fig. 38b/t1, Spur 6-7). (Dies wird auf Filmen nach kürzerer Belichtungszeit noch deutlicher). Höhere cAMP-Gaben wirken also eher inhibierend auf die D11-Expression. In Hs2-Zellen wird D11

Expression zum Zeitpunkt t4 bereits ab 20 μ M cAMP inhibiert (Fig. 39b/t4, Spur 5-7).

Werden Stadium t1 bei Hs1 und Stadium t4 bei Hs2 als equivalent angesehen, so kann daraus geschlossen werden, daß PL3 in Hs2-Zellen mit geringeren cAMP-Konzentrationen induziert wird als in Hs1-Zellen. D11-Expression wird bereits bei geringeren cAMP-Konzentrationen inhibiert.

Eine Zusammenfassung des Musters der Genexpression von PL3- D11- und I42-Gen ist in Tab. 5 zu sehen.

Tab. 5

	Hs1				Hs2			
	t1	t2	t3	t4	t1	t2	t3	t4
PL3	-	-	+	+	-	-	-	-
D11	+	+	+	+	-	-	-	+
I42	++	+	+	+	-	-	+	++

Tab. 5

Expressionsmuster verschiedener Gene in Hs1- und Hs2-Zellen

Das Expressionsmuster wurde anhand von Fig. 38 und Fig. 39 bestimmt.

- wird nicht exprimiert
- + wird exprimiert
- ++ wird stark exprimiert
- ⊕ wird schwach exprimiert

Fig. 38

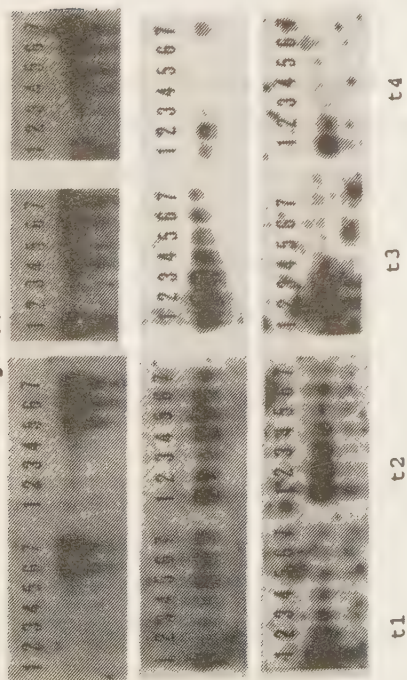


Fig. 39

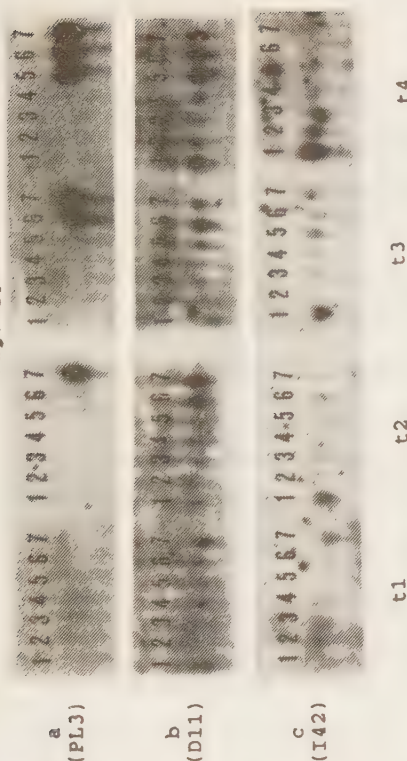


Fig. 38 und 39

Entwicklungsregulierte Induzierbarkeit oncostatins- und oncospore-spezifischer Gene durch cAMP

Hs1- (Fig. 38) und Hs2-Zellen (Fig. 39) wurden auf Wasserrassensplatten ausplattiert, 12 hr bei 4°C inkubiert, dann in 22°C transferiert und

bei Hs1 nach

1 hr (t1)
2.5 hr (t2)
5 hr (t3)
6 hr (t4)

bei Hs2 nach

0.25 hr (t1)
2.5 hr (t2)
6.5 hr (t3)
6 hr (t4)

geerntet

Die einzelnen Entwicklungsstadien wurden in MES/PDF-Puffer (5×10^{-4} M) resuspendiert, und 4 hr lang bei 100 rpm mit oder ohne cAMP geschüttelt.

Sour 1: Zellen, zu dem Zeitpunkt als sie geerntet wurden

Sour 2: geschüttelt ohne Dibutyl-cAMP und ohne cAMP

Sour 3: geschüttelt nur mit Dibutyl-cAMP

Sour 4-7: geschüttelt mit Dibutyl-cAMP und cAMP in folgenden Konzentrationen: 1, 5, 20, 100 μ M

3. hybridisiert mit PL3 b. hybridisiert mit D11 c. hybridisiert mit I42

Zusammenfassend ergibt sich, daß in allen vier beschriebenen Versuchen Hs2-Zellen eher mittels cAMP dazu stimuliert werden konnten PL3- und D11-Gene zu exprimieren als Hs1-Zellen.

Der Vergleich von Hs1- und Hs2-Stadien wird hauptsächlich durch die unterschiedlich lange Entwicklungsdauer erschwert. Im Gegensatz zum Entwicklungszyklus von Hs1, der sehr reproduzierbar ist, ist der Zyklus von Hs2 obendrein sehr variabel, insbesondere die Preaggregations- und Aggregationsphase.

In der Preaggregationsphase gibt es außerdem keinerlei morphologisch erkennbare Anzeichen, um festzustellen, wie weit die Zellen in ihrer Entwicklung bereits fortgeschritten sind. Die Zellen bilden auf der Agarfläche einen gleichmäßigen Rasen, während intrazellulär große Umwälzungen des Stoffwechsels stattfinden (Cardelli et al 1985).

Es bedarf einer Vielzahl von Markern, um ein Stadium ausreichend zu charakterisieren. Hat man sich vom Wildtyp ein Stadium ausgesucht und es ausreichend charakterisiert, ist es erforderlich, vom anderen Stamm viele Entwicklungsstadien in bezug auf die erwähnten Marker durchzutesten, um das entsprechende vergleichbare Stadium zu finden. In der Praxis erweist sich diese Methode als ziemlich aufwendig und bleibt, mangels genügend vieler Marker, immer noch recht willkürlich.

Um die eben geschilderten Schwierigkeiten zu umgehen, habe ich mich entschlossen auf ein eindeutigeres Entwicklungsstadium auszuweichen, nämlich das Slugstadium. Slugs bieten hauptsächlich folgende Vorteile:

a. sie sind morphologisch eindeutig erkennbar, d.h. es bedarf keiner Marker, um dieses Stadium erst zu definieren und gegen frühere oder spätere Stadien abzugrenzen.

b. Slugs stellen einen stabilen Zustand dar, der nicht, wie die Aggregationsphase, durch große Veränderungen in Gen-expression und Proteinsynthese gekennzeichnet ist.

c. Das Arbeiten mit Slugzellen hat außerdem den entscheidenden Vorteil, daß mit den Zellen gearbeitet wird, bei denen das Phänomen der Proportionsregulation beobachtet wurde. In diesem Stadium kann davon ausgegangen werden, daß das System, das an Produktion, Erkennung und Weiterleitung extrazellulärer Substanzen beteiligt ist, voll ausgebildet, und bei Hs2 in jener charakteristischen Art und Weise verändert ist, die zu den beobachteten Phänomenen führt.

Der einzige Nachteil beim Arbeiten mit differenzierten Zellen besteht darin, daß die späten Gene bereits exprimiert werden, so daß also eine Induktion mittels cAMP nicht mehr verfolgt werden kann.

Slugzellen, die disaggregiert und unter Bedingungen, die eine Reaggregation verhindern, geschüttelt werden, dedifferenzieren und verlieren die prestalk- und prespore- spezifischen mRNAs. Durch Zugabe von cAMP kann diese Dedifferenzierung verhindert werden.

Diesen Effekt von cAMP habe ich benutzt, um als Maß für die Sensitivität von differenzierten Zellen auf cAMP, die cAMP-Konzentration zu bestimmen, die mindestens nötig ist, um PL3-Expression zu stabilisieren.

6.2.4. Stabilisierung prespore-spezifischer Genexpression in dissaggregierten Slugzellen

Slugs wurden mit einem feinen Pinsel von der Agaroberfläche abgeschabt und in Puffer aufgenommen. Danach wurden sie durch ein Nylontuch filtriert und mehrmals gewaschen. Dies befreit sie von den mitabgeschabten, nichtaggregierten Einzelzellen. Die Slugs wurden dann 5 Minuten in Cellulaselösung durch kräftiges Pipettieren in Einzelzellen zerlegt, danach einmal gewaschen und in MES/PDF-Puffer, mit oder ohne EDTA (10 mM), auf 5×10^6 - 1×10^7 /ml resuspendiert.

Je 10 ml dieser Zellsuspension wurde mit Dibutyryl-cAMP (500 μ M) und mit oder ohne cAMP 4 Stunden lang geschüttelt. Danach wurde RNA aus diesen Zellen isoliert, und auf das Vorhandensein von PL3-Transkripten geprüft.

a. Schütteln unter Bildung von Agglomeraten

Slugzellen, die in MES/PDF ohne EDTA aufgenommen wurden, wurden bei 100 rpm 4 Stunden lang geschüttelt. Die Zellen verklumpen dabei recht stark und bilden große Agglomerate.

Wie aus Fig. 40 - 42 ersichtlich wird, wird mit zunehmender cAMP-Konzentration PL3 zwar stärker exprimiert, verschwindet aber nicht vollständig durch Schütteln. Dies gilt sowohl für Hs1- als auch für Hs2-Zellen.

1 2 3 4 5 6 7 8 9



Fig. 40

1 2 3 4 5 6 7 8

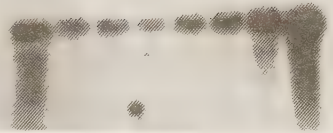


Fig. 42

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

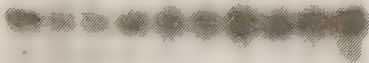


Fig. 41

Fig. 40 - 42

Effekt von cAMP auf prespore-Genexpression in disaggregierten, langsam geschüttelten Hs1- und Hs2-slugzellen

Hs1-slugs (Fig. 40) und Hs2-slugs (Fig. 41 + 42) wurden mittels Cellulase dissoziiert, in MES/PDF-Puffer auf 1×10^7 /ml verdünnt und 4 Stunden bei 100 rpm geschüttelt.

RNA wurde aus den Zellen isoliert, 10 µg auf Formaldehydgelen aufgetrennt, auf Nitrocellulose geblottet und mit 32 P-markiertem PL3-cDNA-Klon hybridisiert.

- Spur 1: Slugzellen zu Beginn des Experiments
 Spur 2: geschüttelt ohne Dibutyryl-cAMP und ohne cAMP
 Spur 3: geschüttelt nur mit Dibutyryl-cAMP

Fig. 40: Hs1-slugs

- Spur 4-9: geschüttelt mit Dibutyryl-cAMP und cAMP in folgenden Konzentrationen: 0,2, 0,5, 1, 3, 10, 100 µM

Fig. 41: Hs2-slugs

- Spur 4-10: geschüttelt mit Dibutyryl-cAMP und cAMP in folgenden Konzentrationen: 0,2, 0,5, 1, 3, 5, 10, 100 µM

Fig. 42: Hs2-slugs

- Spur 4-8: geschüttelt mit Dibutyryl-cAMP und cAMP in folgenden Konzentrationen: 0,2, 0,5, 1, 5, 100 µM

b. Schütteln ohne Bildung von Agglomeraten

Um den Faktor Zellkontakt auszuschalten, wurde zusätzlich 10 mM EDTA zu den disaggregierten Zellen gegeben und bei 250 rpm geschüttelt. Zellproben, die nach 4 Stunden entnommen und unter dem Mikroskop betrachtet wurden, zeigten nur Einzelzellen oder Klumpen von 2 - 3 Zellen.

Hs1-Zellen, die unter diesen Bedingungen und mit weniger als 3 μM cAMP geschüttelt wurden, verloren ihre PL3-Transkripte, wohingegen Zellen, die mit ≥ 3 μM cAMP geschüttelt wurden, ihre Transkripte behielten. Dieser Versuch wurde 2x mit demselben Ergebnis durchgeführt (siehe Fig. 43 und 44).

Hs2-Zellen zeigen eindeutig ein anderes Verhalten. Der Versuch mit Hs2-slugzellen wurde 4x durchgeführt mit folgendem Ergebnis: in zwei Fällen konnte der Verlust der PL3-Transkripte ab einer Konzentration von 10 μM verhindert werden (Fig. 45 und 48), in einem Fall nur mit 100 μM (Fig. 47), und in einem Fall konnte bei keiner der getesteten cAMP-Konzentrationen (bis zu 100 μM) die PL3-Transkription stabilisiert werden (Fig. 46).

Hs1

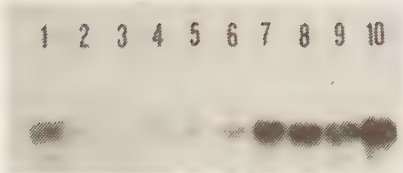


Fig. 43



Fig. 44

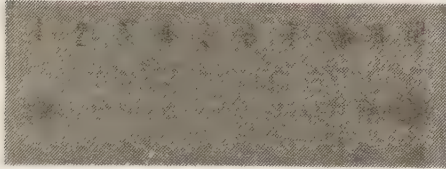


Fig. 45

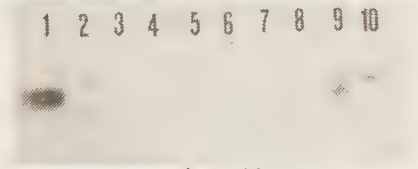


Fig. 46



Fig. 47

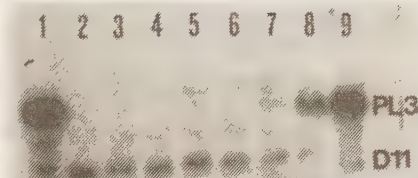


Fig. 48

Fig. 43 - 48

Effekt von cAMP auf prespore-Genexpression in disaggregierten, schnell geschüttelten Hs1- und Hs2-Slugzellen

Hs1-slugs (Fig. 43 + 44) und Hs2-slugs (Fig. 45 - 48) wurden mittels Cellulase dissoziiert, in MES/PDF-Puffer + 10 mM EDTA auf 9×10^6 /ml verdünnt und 4 Stunden bei 250 rpm geschüttelt. RNA wurde aus den Zellen isoliert, 10 µg auf Formaldehydgelen aufgetrennt, auf Genescreen geblottet und mit 32 P-markiertem PL3-cDNA-Klon hybridisiert.

Fig. 43 - 47:

- Spur 1: Slugzellen zu Beginn des Experiments
- Spur 2: geschüttelt ohne Dibutyryl-cAMP und ohne cAMP
- Spur 3: geschüttelt nur mit Dibutyryl-cAMP

Fig. 43, 45, 46, 47:

- Spur 4-10: geschüttelt mit Dibutyryl-cAMP und cAMP in folgenden Konzentrationen: 0.2, 0.5, 1, 3, 5, 10, 100 µM

Fig. 44:

- Spur 4-10: geschüttelt mit Dibutyryl-cAMP und cAMP in folgenden Konzentrationen: 0.2, 1, 3, 5, 10, 30, 100 µM

Fig. 48:

- Spur 1: Slugzellen zu Beginn des Experiments
- Spur 2: geschüttelt nur mit Dibutyryl-cAMP
- Spur 3-9: geschüttelt mit Dibutyryl-cAMP und cAMP in folgenden Konzentrationen: 0.2, 0.5, 1, 3, 5, 10, 100 µM

Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zur eingangs erwähnten gesteigerten Sensitivität von Hs2 gegenüber cAMP. Eine Möglichkeit die Ergebnisse zu erklären, besteht in der Annahme eines "Inhibitors" der prespore-Differenzierung, der von Hs2-Zellen ins Medium sezerniert wird.

Von einigen Faktoren, wie z.B. Adenosin (Schaap and Wang 1986) und DIF (Wang et al 1986) ist bekannt, daß sie auf die Induktion der prespore-Differenzierung durch cAMP inhibierend wirken.

Ein weiterer Faktor, der an der Expression später Gene beteiligt ist, ist CMF (conditioned medium factor). CMF wird von Zellen während der ganzen Entwicklung produziert und wirkt stimulierend auf prestalk- und prespore-Genexpression (Mehdy and Firtel 1985).

Möglicherweise sind für die Stabilisierung von prespore-Genexpression in disaggregierten Slugzellen zusätzlich zu cAMP noch andere Faktoren ausschlaggebend. Eine Hypothese wäre, daß Hs2 mehr eines inhibierenden oder weniger eines stimulierenden Stoffes produziert. Aus dieser Annahme würde folgern, daß die cAMP-abhängige Stabilisierung der prespore-Genexpression auch von der Zellkonzentration abhängig ist. Bei geringerer Zellzahl wäre dementsprechend ein niedrigerer Spiegel der hypothetischen Substanz zu erwarten. Um diese Hypothese zu testen, wurden Hs1- und Hs2-slugzellen in verschiedenen Zellkonzentrationen mit cAMP geschüttelt. Das Ergebnis ist in Fig. 49 - 50 zu sehen. Es zeigt sich, daß höhere Zellkonzentrationen, sowohl bei Hs1 als auch bei Hs2, inhibierend auf prespore-Genexpression wirken. Bei Hs2 kann nur bei sehr geringen Zellkonzentrationen ($1-2 \times 10^6$ /ml) die prespore-Genexpression mit $5 \mu\text{M}$ cAMP stabilisiert werden. Bei einer Zellkonzentration von $5-10 \times 10^6$ /ml (mit der auch die

Versuche von Fig. 45 - 48 durchgeführt wurden) kann mit 5 μ M cAMP keine Stabilisierung erreicht werden.

Bei Hs1-Zellen ist der inhibierende Effekt hoher Zellkonzentrationen weniger stark ausgeprägt. Bei einer Zellkonzentration von 1×10^6 /ml kann sogar eine leichte Induktion mittels 0.5 μ M cAMP festgestellt werden. Im Gegensatz zu Hs2 kann bei einer Zellkonzentration von 5×10^6 /ml noch mit 5 μ M cAMP der Verlust der PL3-Transkripte verhindert werden.

Diese Ergebnisse unterstützen die Annahme, daß von den Zellen ein Faktor sezerniert wird, der inhibierend auf die Stabilisierung der prespore-Genexpression wirkt. Hs2-Zellen produzieren entweder mehr dieses Stoffes, oder sie reagieren sensibler darauf.

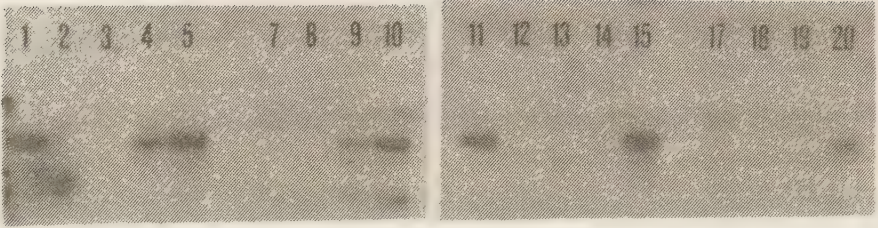


Fig. 49



Fig. 50

Fig. 49 und Fig. 50:

Abhängigkeit der prespore-Genexpression in disaggregierten Hs1- und Hs2-slugzellen von der Zellkonzentration

Hs1- (Fig. 50) und Hs2-slugs (Fig. 49) wurden mittels Cellulase dissoziiert, in MES/PDF-Puffer + 10 mM EDTA auf 1×10^6 /ml (Spur 2 - 5), 2×10^6 /ml (Spur 7 - 10), 5×10^6 /ml (Spur 11 - 15) und 1×10^7 /ml (Spur 17 - 20) verdünnt und 4 Stunden bei 250 rpm geschüttelt.

RNA wurde aus den Zellen isoliert, 10 µg auf Formaldehydgelen aufgetrennt, auf Nitrocellulose geblottet und mit ^{32}P -markiertem PL3-cDNA-Klon hybridisiert.

- Spur 1: Slugzellen zu Beginn des Experiments
 Spur 2: geschüttelt nur mit Dibutyryl-cAMP
 Spur 3-5: geschüttelt mit Dibutyryl-cAMP und cAMP in folgenden Konzentrationen: 0.5, 5, 100 µM
 Spur 7: geschüttelt nur mit Dibutyryl-cAMP
 Spur 8-10: geschüttelt mit Dibutyryl-cAMP und cAMP in folgenden Konzentrationen: 0.5, 5, 100 µM
 Spur 11: Slugzellen zu Beginn des Experiments
 Spur 12: geschüttelt nur mit Dibutyryl-cAMP
 Spur 13-15: geschüttelt mit Dibutyryl-cAMP und cAMP in folgenden Konzentrationen: 0.5, 5, 100 µM
 Spur 17: geschüttelt nur mit Dibutyryl-cAMP
 Spur 18-20: geschüttelt mit Dibutyryl-cAMP und cAMP in folgenden Konzentrationen: 0.5, 5, 100 µM

Um zu testen, ob Hs2-Zellen sensitiver auf diesen Stoff reagieren, müßten Hs1- und Hs2-Zellen im selben Medium geschüttelt werden. Eine Annäherung an dieses ideale Experiment besteht darin, Hs1 und Hs2 zwar in verschiedenen Kolben zu schütteln, jedoch deren Medien sooft als möglich auszutauschen. Dieses Experiment wurde durchgeführt, und das Ergebnis ist in Fig. 51 zu sehen. Die Medien wurden alle 30 Minuten gewechselt, insgesamt wurde 4 Stunden lang geschüttelt. Im Durchschnitt wurde das Medium also 2 Stunden lang von Hs2 und 2 Stunden lang von Hs1 konditioniert. Beide Stämme waren annäherungsweise der gleichen Umgebung ausgesetzt. Hs1- und Hs2-Zellen verhalten sich wie in den zuvor beschriebenen Schüttelexperimenten, d.h. in Hs1 wird PL3-Expression ab 3 μM cAMP, in Hs2 erst ab 100 μM cAMP stabilisiert.

Durch diesen Versuch kann nun auch ausgeschlossen werden, daß die Ergebnisse, die mit dissoziierten Hs2-slugzellen erzielt wurden (siehe Fig. 45 - 48), auf einer gesteigerten Aktivität der Phosphodiesterase beruhen. Würden Hs2-slugzellen einen Großteil des vorhandenen cAMPs abbauen, so daß die tatsächlich vorherrschende cAMP-Konzentration viel geringer ist als angenommen, so müßten in dem eben geschilderten Versuch (Fig. 51) auch Hs1-slugzellen nun einem erniedrigten cAMP-Spiegel ausgesetzt sein. Da Hs1-slugzellen sich aber hier ebenso verhalten wie in Versuchen, in denen sie ungestört geschüttelt wurden (Fig. 43 und Fig. 44), kann davon ausgegangen werden, daß die cAMP-Konzentration sich in den beiden Versuchsserien nicht unterscheidet. Hs2-Zellen bauen also das vorhandene cAMP nicht ab.

Um zu testen, ob PL3-Expression auch in Hs1-Zellen "inhibiert" werden kann, wurden Hs1-Zellen in von Hs2 konditioniertem Medium geschüttelt. Es zeigte sich, daß die Dauer der Konditionierung eine entscheidende Rolle spielt. Medium, das nur 2.5 Stunden von Hs2 konditioniert wurde, hatte keinen Effekt auf PL3-Expression, ab 3.5 Stunden Konditionierung war die PL3-Expression jedoch gehemmt (siehe Fig. 52).

Zusammenfassend läßt sich sagen daß, im Gegensatz zu den Induktionsversuchen, zur Aufrechterhaltung der prespore-Genexpression in Hs2-Zellen mehr cAMP benötigt wird als in Hs1-Zellen.



Fig. 51 A

Fig. 51 B

Fig. 51

Prespore-Genexpression in disaggregierten Hs1- und Hs2-slugzellen unter ständigem Medienwechsel

Hs1- (Fig. 51 A) und Hs2-slugs (Fig. 51 B) wurden mittels Cellulase in Einzelzellen zerlegt, in MES/PDF-Puffer + 10 mM EDTA auf $6-7 \times 10^6$ /ml verdünnt und 4 Stunden bei 250 rpm geschüttelt. Alle 30 min wurden die Zellen pelletiert und die Medien ausgetauscht, d.h. Hs2-Pellets wurden in Hs1-Medium aufgenommen und umgekehrt.

- Spur 1: Slugzellen zu Beginn des Experiments
 Spur 2: geschüttelt nur mit Dibutyryl-cAMP
 Spur 3-7: geschüttelt mit Dibutyryl-cAMP und cAMP in folgenden Konzentrationen: 1, 3, 5, 10, 100 μ M

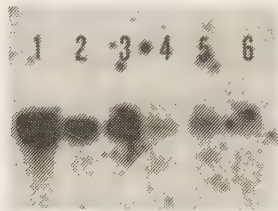


Fig. 52

Fig. 52

Prespore-Genexpression disaggregierter Hs1-Zellen in von Hs2 konditioniertem Medium

Hs1-slugs wurden mittels Cellulase dissoziiert, in von Hs2-Slugzellen konditioniertem Medium aufgenommen, Dibutyryl-cAMP (500 μ M) und 3 μ M cAMP zugegeben und 4 Stunden bei 250 rpm geschüttelt.

Gesamt-RNA wurde isoliert, 20 μ g auf Formaldehydgelen aufgetrennt, auf Nitrocellulose gebロットet und mit 32 P-markiertem PL3-cDNA-Klon hybridisiert.

Konditioniertes Medium wurde folgendermaßen hergestellt: Hs2-slugzellen wurden dissoziiert, in einer Konzentration von 1×10^7 /ml in MES/PDF-Puffer + 10 mM EDTA + Dibutyryl-cAMP (500 μ M) aufgenommen und bei 250 rpm geschüttelt. Ab 1.5 Stunden wurde stündlich ein Kolben entnommen, die Zellen abzentrifugiert und das Medium eingefroren.

- Spur 1: Hs1-slugzellen zu Beginn des Experiments
 Spur 2-6: Hs1-slugzellen, 4 Stunden geschüttelt in Medium, das von Hs2 folgende Zeiten konditioniert wurde:
 1.5, 2.5, 3.5, 4.5, 5.5 Stunden

Diskussion

In dieser Arbeit habe ich versucht nachzuprüfen, ob eine Änderung in der Sensitivität auf cAMP die Ursache für die beobachteten Unterschiede der Zelltypproportionen in Hs1 und Hs2 darstellt. Die Annahme, Hs2 reagiere primär sensitiver auf cAMP, führt zu einer sekundären Senkung in der Konzentration des extrazellulären cAMP-Signals (Blaschke et al 1986, MacWilliams et al 1985). Diese Vorhersage zu testen, war eines der Ziele meiner Arbeit.

cAMP-Spiegel und Adenylatcyclaseaktivität

Es existieren keine Techniken, um direkt extrazelluläres cAMP in multizellulären Geweben zu messen. Daher wurde die Gesamtkonzentration, d.h. die Summe aus intra- und extrazellulärem cAMP, im Sluggewebe bestimmt. Zwischen Hs1- und Hs2-slugs konnte dabei kein gravierender Unterschied festgestellt werden. Da jedoch der intrazelluläre Raum sehr viel größer ist als der extrazelluläre, sind kleinere Unterschiede in der Konzentration an extrazellulärem cAMP wahrscheinlich mit dieser Methode nicht zu erkennen. Daher wurden zusätzlich die Enzymaktivitäten, die an Produktion und Abbau extrazellulären cAMPs beteiligt sind, und die Bindungsproteine, die für die Wahrnehmung extrazellulären cAMPs verantwortlich sind, untersucht.

Durch Messung der basalen Adenylatcyclaseaktivität wurde gezeigt, daß vergleichbare Stadien von Hs1 und Hs2 die gleiche Kapazität zur cAMP-Produktion besitzen. Da bekannt ist, daß die Aktivität der Adenylatcyclase durch cAMP-Pulse stimuliert werden kann, wurden "relay Experimente" durchgeführt. Nicht nur aggregierende Zellen sondern auch postaggregative Entwicklungsstadien können einen cAMP-Puls mittels "relay response" weiterleiten (Kesbeke et al 1986, Otte et al 1986). Die Aktivität der stimulierten Adenylatcyclase wurde sowohl während der Aggregation als auch nach Abschluß der Aggregation gemessen, und in keinem Fall konnte ein signifikanter Unterschied zwischen Hs1 und Hs2 festgestellt werden.

Phosphodiesteraseaktivität

Die Aktivität der zellgebundenen cAMP-spezifischen Phosphodiesterase (membrangebunden und intrazellulär) wurde ebenfalls bestimmt. Sowohl die maximale Aktivität während des Aggregationsstadiums als auch die geringere Aktivität im Slugstadium ist in Hs1- und Hs2-Zellen gleich hoch. Die zeitliche Regulation der Phosphodiesterase im Laufe des Entwicklungsvorgangs ist korreliert mit morphologisch eindeutig definierbaren Stadien. So ist in beiden Fällen die Aktivität gering im vegetativen Stadium, erreicht ihren maximalen Wert kurz vor Beginn der Aggregation, bleibt hoch während der ganzen Dauer der Aggregation, und sinkt nach Abschluß der Aggregation mit tipbildung.

Hs2 unterscheidet sich von Hs1 durch die längere, und in verschiedenen Versuchen variable, Aggregationsphase. In zwei Entwicklungsreihen von Hs2 mit unterschiedlich langer Aggregationsphase konnte gezeigt werden, daß die Phosphodiesteraseaktivität dem jeweiligen Entwicklungszustand entspricht.

In suspensionsgehungerten Zellen konnten zwei kinetisch unterschiedliche Enzymformen nachgewiesen werden. Eine Form hat einen K_m -Wert von etwa $2.6 \mu\text{M}$, die andere Form von etwa $0.1 - 0.3 \text{ mM}$. Zwischen Hs1 und Hs2 existieren in dieser Hinsicht keinerlei Unterschiede. In diesem Zusammenhang sei darauf hingewiesen, daß auch bei Untersuchung der extrazellulären Phosphodiesterase zwei kinetisch unterschiedlich aktive Phosphodiesteraseformen gefunden wurden. Eine Form mit einer sehr hohen K_m , 2 mM (Chang 1968), und eine Form mit sehr geringer K_m , $4 \mu\text{M}$ (Riedel and Gerisch 1971). Dies sind vermutlich alternative Formen desselben Proteinmoleküls, denn Chassy (1972) konnte zeigen, daß in einem zellfreien System die niedrige K_m -Form spontan in die hohe K_m -Form übergehen kann. Durch Zugabe von DTT kann außerdem die hohe K_m -Form wieder in die niedrige K_m -Form überführt werden.

Zusätzlich zur extrazellulären Phosphodiesterase wird außerdem ein Inhibitormolekül ausgeschieden (Riedel and Gerisch 1971), wodurch der K_m -Wert des Phosphodiesterase-Enzyms erhöht wird. Die beobachtete hohe K_m -Form früherer Versuche ließ sich somit auf die Bildung eines Enzym-Inhibitor-Komplexes zurückführen.

Später konnte außerdem gezeigt werden, daß die Aktivierung der hohen K_m -Form durch DTT (Chassy 1972) auf einer Inaktivierung des Inhibitorproteins beruhte (Franke and Kessin 1981).

Analog zu diesen Beobachtungen kann nun geschlossen werden, daß auch ein Teil der zellgebundenen Phosphodiesterase als Enzym/Inhibitor-Komplex vorliegt; daher der scheinbar hohe K_m -Wert im Bereich höherer Substratkonzentrationen.

Zwischen Hs1- und Hs2-slugzellen besteht ebenfalls kein Unterschied in der Phosphodiesteraseaktivität. Die gemessene Slugpräparation setzt sich jedoch aus prestalk- und prespore-Zellen zusammen, wobei bekannt ist, daß beide Zelltypen unterschiedlich kinetisch aktive Phosphodiesterase-Formen besitzen (Rutherford and Brown 1983). In prestalk-Zellen wurde ein K_m -Wert von 3 - 10 μM , in prespore-Zellen von 0.3 - 2 mM ermittelt. Die Autoren stellten ebenfalls die Hypothese eines endogenen Inhibitors auf, der nur in prespore-Zellen vorliegt und den K_m -Wert der Phosphodiesterase erhöht. Bei einer Substratkonzentration von 50 μM cAMP (siehe Tab. 3) würde man hauptsächlich die niedrige K_m -Form der prestalk-Zellen messen (maximale Aktivität, da Substrat im Sättigungsbereich). Bei Annahme einer K_m von etwa 1 mM für das Enzym in prespore-Zellen würde man nur 5 % der maximalen Aktivität bei 50 μM cAMP als Substrat erreichen.

Da jedoch bei Lyse der Zellen der Inhibitor frei wird, und das prestalk-Enzym auch inhibiert werden kann (Brown and Rutherford 1980), wird vermutlich nur die inhibierte Form des Enzyms gemessen.

All diese Daten liefern keine Hinweise auf einen geänderten cAMP-Spiegel in Hs2. Es besteht jedoch die Möglichkeit, daß die, aufgrund der Sensitivitätsänderung erwartete Änderung des extrazellulären cAMP-Spiegels, relativ gering ist und mit den hier angewandten Methoden nicht erkannt werden kann.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es nachzuweisen, ob tatsächlich eine Sensitivitätsänderung bezüglich cAMP in Hs2 vorliegt. Die direkteste Methode erschien mir in der Analyse der Bindungsaktivität von cAMP zu liegen, da eine Bindung von cAMP an membrangebundene Rezeptoren den ersten Schritt in der Weiterleitung des cAMP-Signals darstellt.

cAMP-Rezeptoren

Es konnte eine Veränderung in der Anzahl cAMP-spezifischer Rezeptoren bei Hs2 festgestellt werden. Eine genauere Analyse der Bindungsaktivität ergab, daß Hs2 2-3x soviel niedrigaffine cAMP-Bindungsstellen besitzt als Hs1. Die Dissoziationskonstante selbst bleibt unverändert. Die hochaffinen Bindungsstellen bleiben sowohl bezüglich ihrer Affinität als auch bezüglich ihrer Anzahl unverändert. Dies gilt sowohl für aggregierende als auch für Slugzellen.

Aufgrund der curvilinearen scatchardplots, die sich bei cAMP-Bindungsstudien bei *Dictyostelium discoideum* ergeben, muß auf die Existenz zweier Klassen von Bindungsstellen unterschiedlicher Affinität geschlossen werden (Green and Newell 1975, Henderson 1975, Mullens and Newell 1978). Ob es sich dabei jedoch tatsächlich um zwei verschiedene cAMP-bindende Moleküle verschiedener Affinität handelt, ist fraglich. Neuere Untersuchungen (van Haastert and de Wit 1984) zwingen vielmehr zu der Annahme, daß es sich um nur einen Rezeptortyp handelt, der in verschiedenen Zustandsformen, d.h. in einer hochaffinen und einer niedrigaffinen Form, vorliegen kann. Van Haastert schloß dies aus der zeitlichen Kinetik der Bindungsreaktion. Ein Maximum der cAMP-Bindung erfolgt 6 Sekunden nach cAMP-Zugabe, danach sinkt die Bindungsaktivität kontinuierlich ab, bis nach 45 Sekunden ein Gleichgewichtszustand erreicht ist. Der Abfall der cAMP-Bindung spiegelt den Übergang von hochaffinen zu niedrigaffinen Bindungsstellen wider. Van Haastert konnte berechnen, daß in Abwesenheit von cAMP etwa 40 % der Bindungsstellen in der hochaffinen Form vorliegen. Erfolgt cAMP-Bindung, sinkt die Anzahl der hochaffinen Stellen auf 10 %.

Zwei weitere Klassen von Bindungsstellen wurden durch Dissoziationsstudien entdeckt. Wird zu ^3H -cAMP-Rezeptorkomplexen ein Überschuß an kaltem cAMP zugegeben, dissoziiert das gebundene cAMP ab. Dies geschieht sehr schnell, der Großteil des gebundenen cAMP dissoziiert mit einer Halbwertszeit von etwa 1 sec ab, ein geringer Anteil dissoziiert jedoch langsamer, mit $t_{1/2}$ von 15 sec (S-site) oder mit $t_{1/2} = 120$ sec ab (SS-site) (van Haastert and de Wit 1984, van Haastert 1985a, van Haastert et al 1986).

Die niedrigaffinen Bindungsstellen gehören zum schnell-dissoziierenden Typ ($t_{1/2} = 0.7 \text{ sec}$), die hochaffinen Bindungsstellen setzen sich aus 3 Komponenten zusammen: 67 % gehören zum schnell-dissoziierenden Typ ($t_{1/2} = 1.5 \text{ sec}$), 24 % sind S-sites, und 9 % sind SS-sites.

Möglicherweise sind die verschiedenen Klassen des cAMP-Rezeptors für verschiedene Reaktionen zuständig. Die beiden am besten untersuchten cAMP-induzierten Reaktionen sind eine Aktivierung der Adenylatcyclase und eine Aktivierung der Guanylatcyclase. Die Weiterleitung des extrazellulären cAMP-Signals bis zur Adenylatcyclase oder Guanylatcyclase erfolgt wahrscheinlich über zwei verschiedene Wege, beginnend mit zwei unterschiedlichen Rezeptorklassen. Es wird angenommen, daß die Bindung an die schnell dissoziierenden niedrigaffinen Bindungsstellen für die Aktivierung der Adenylatcyclase, und die Bindung an die langsamdissoziierenden hochaffinen Bindungsstellen (S- und SS-sites) für die Aktivierung der Guanylatcyclase verantwortlich sind. Mehrere Befunde führen zu dieser Annahme:

1. die zeitliche Kinetik des cGMP- und cAMP-Anstiegs nach cAMP-Stimulierung:

a. Intrazelluläres cGMP beginnt bereits 2 Sekunden nach Stimulierung mit cAMP anzusteigen, und hat sein Maximum nach 10 Sekunden erreicht (Mato et al 1977). Wie bereits erwähnt, sind in den ersten 6 Sekunden nach Stimulierung hauptsächlich die hochaffinen Bindungsstellen an der Bindungsreaktion beteiligt.

b. das Maximum des cAMP-Anstiegs ist erst nach 2 Minuten erreicht, wenn ein Hauptteil der Bindungsstellen im niedrigaffinen Zustand vorliegt.

Der cGMP- und cAMP-Anstieg ist außerdem korreliert mit Änderungen in der optischen Dichte der Zellsuspension, die photometrisch verfolgt werden kann. Nach Zugabe von cAMP erhält man einen ersten peak unmittelbar nach cAMP-Zugabe (Gerisch and Hess 1974), der zeitlich zusammenfällt mit dem Anstieg des intrazellulären cGMP-Spiegels, und einen zweiten peak 1 - 2 Minuten später (Gerisch and Hess 1974), der

zeitlich zusammenfällt mit dem Anstieg des cAMP-Spiegels. Dosis-response-Kurven zeigen, daß das Ausmaß des ersten peaks direkt proportional ist dem Anteil besetzter Hochaffinitäts-rezeptoren, und das Ausmaß des zweiten peaks dem Anteil besetzter niedrigaffiner Rezeptoren (Barclay and Henderson 1986).

2. cGMP- und cAMP-Anstieg in downregulierten Zellen:

Eine sogenannte Downregulierung, d.h. eine drastisch reduzierte Bindungsaktivität, wurde nach längerer Inkubation (30 min) von Zellen in Gegenwart hoher cAMP-Konzentrationen (1 mM) beobachtet. Scatchardanalysen solcher downregulierter Zellen zeigen, daß die Anzahl der Bindungsstellen um 80 - 90% reduziert wurde, nicht deren Affinität (Klein and Juliani 1977). Genauere Analysen ergaben, daß nur die hoch- und niedrigaffinen schnelldissoziierenden Bindungsstellen down-reguliert sind. Gleichzeitig ist auch der intrazelluläre cAMP-Anstieg nach Zugabe eines cAMP-Stimulus um 80 - 90 % erniedrigt (Kesbeke and van Haastert 1985).

Die Anzahl der langsamdissoziierenden Bindungsstellen wird in Gegenwart von cAMP nicht reduziert, und auch die Akkumulierung intrazellulären cGMPs ist nicht downreguliert (Kesbeke and van Haastert 1985).

3. Effekt von extrazellulärem Ca^{2+} auf cAMP-induzierten cAMP- und cGMP-Anstieg:

a. Zugabe von geringen Konzentrationen an Ca^{2+} (20 μM) führt einerseits zu einer Blockierung des Übergangs von hoch- zu niedrigaffinen Stellen und andererseits zu einer Inhibierung der Adenylatcyclase-Aktivierung (van Haastert 1985b).

b. Zugabe hoher Konzentrationen an Ca^{2+} (400 μM) ändert die Affinität der langsam dissoziierenden Bindungsstellen und gleichzeitig die Kinetik der cAMP-induzierten cGMP-Akkumulierung.

Vergleich mit anderen Rezeptormutanten

Kürzlich wurde eine weitere Mutante beschrieben, die ebenfalls geänderte Rezeptoraktivitäten aufweist (Barclay and Henderson 1986). Im Gegensatz zu Hs2 ist jedoch die Zahl der hochaffinen Rezeptorstellen um einen Faktor 2-3 gestiegen. Gleichzeitig ist die Dissoziationskonstante der niedrigaffinen Bindungsstellen um eine Zehnerpotenz erhöht und liegt bei etwa 3 μM . Ansonsten ist über diese Mutante wenig bekannt, und sie kann daher nicht gut mit Hs2 verglichen werden. Insbesondere erhebt sich die Frage nach den Zelltypproportionen dieser Mutante, die jedoch leider nicht bestimmt wurden. Einen indirekten Hinweis darauf könnte man höchstens in der abnormalen Proportionierung der Fruchtkörper sehen. In der Mutante ist das Verhältnis von Sporenkopfdurchmesser zu Länge des Stiels sehr viel größer als in Wildtypzellen. Davon ausgehend könnte man vermuten, daß eventuell auch das prespore/prestalk-Verhältnis in Slugs erhöht ist. Jedoch ist zu berücksichtigen, daß ein Zusammenhang zwischen Proportionen im Fruchtkörper und im Slug nicht immer gegeben ist (Mac Williams, persönliche Mitteilung). Eine Eigentümlichkeit dieser Mutante besteht in der Neigung zu multipler tipbildung, was auch bei Hs2 zu beobachten ist. In diesem Zusammenhang sei erwähnt, daß Behandlung mit Koffein ebenfalls zu multipler tipbildung führt und gleichzeitig das prespore/prestalk-Verhältnis in Slugs erhöht (Wang and Schaap 1985). Es erhebt sich somit die Frage, ob ein Zusammenhang besteht zwischen multipler tipbildung und erhöhtem prespore-Anteil.

Ein direkter Zusammenhang zwischen erhöhter Rezeptorzahl und erhöhtem prespore/prestalk-Verhältnis kann jedoch nicht ohne weiteres aufgestellt werden, da auch G(-)-Zellen (Zellen gewachsen in Medium ohne Glucose) im Vergleich zu G(+)-Zellen (Zellen gewachsen in Medium mit Glucose) vermehrt cAMP-Rezeptoren aufweisen (Inouye and Takeuchi 1982). Slugs aus G(-)-Zellen besitzen jedoch ein *kleineres* prespore/prestalk-Verhältnis als Slugs aus G(+)-Zellen (Garrod and Ashworth 1972, Leach et al 1973). In einigen anderen Punkten erinnert das Verhalten von G(-)-Zellen jedoch an Hs2. So besitzen beide eine verlängerte Pre-aggregationsphase und unregelmäßige Aggregationsströme, die oft in mehrere Zentren aufbrechen

(Inouye and Takeuchi 1982). Diese Eigenschaften stehen vermutlich in Zusammenhang mit erhöhter Rezeptorzahl.

Es ist bekannt, daß der extrazelluläre cAMP-Spiegel einen Einfluß auf die Dauer der Preaggregationsphase (Interphase) ausübt. Durch Zugabe von externem cAMP wird die Aggregation verzögert, d.h. die Dauer der Interphase verlängert (Wier 1977). Umgekehrt führt eine Senkung des extrazellulären cAMP-Spiegels (durch Zugabe von Phosphodiesterase) zu einer Verkürzung der Preaggregationsphase (Inouye and Takeuchi 1982). Hs2- (und G-) Zellen verhalten sich also so, als ob sie einem höheren cAMP-Spiegel ausgesetzt sind als Hs1- (oder G+) Zellen. Dieser Effekt könnte durch eine Erhöhung der Rezeptorzahl hervorgerufen werden, da bei gleicher extrazellulärer cAMP-Menge Hs2-Zellen mehr cAMP binden können als Hs1-Zellen, und somit eine höhere cAMP-Konzentration vorgetäuscht wird.

Ein weiteres Indiz für die These, daß Hs2-Zellen sich so verhalten wie Zellen die einem hohen cAMP-Spiegel ausgesetzt sind, liefert der Befund, daß in Hs2-Zellen keine Discoidin I-Transkripte nachzuweisen sind, und späte Gene im Vergleich zu Hs1 (bezogen auf vergleichbare morphologische Stadien) frühzeitig exprimiert werden. Dieses Verhalten ist identisch mit dem Verhalten von Wildtypzellen, die zu einem frühen Zeitpunkt ihrer Entwicklung hohen Konzentrationen an externem cAMP ausgesetzt wurden (Williams et al 1980).

Discoidinexpression in Hs1 und Hs2

Es wurde gezeigt, daß die Discoidinsynthese in Hs2-Zellen stark vermindert ist, andere Parameter der Frühentwicklung jedoch normal sind.

Discoidin wird sehr früh in der Entwicklung, wenn sich die ersten Zellkontakte bilden, synthetisiert, und es wurde lange Zeit vermutet, Discoidin sei maßgeblich an der Ausbildung des Zellkohesionssystems beteiligt. Eine Mutante (Ray et al 1979) trug zu dieser Vorstellung bei, da sie kein Discoidin bildete und gleichzeitig auch nicht aggregieren konnte. Eine Revertante war in der Lage zu aggregieren und bildete gleichzeitig aktives Discoidin (Shinnick and Lerner 1980).

Alle Versuche, die Zell-Zell-Adhesion mittels Discoidin-Antikörper (Springer and Barondes 1980) oder Discoidin selbst (Rosen et al 1973) zu blockieren, schlugen jedoch fehl.

Es konnte jedoch gezeigt werden, daß Discoidin an einer Zell-Substrat-Adhesion beteiligt ist, wodurch eine geordnete Ausbildung von Zellströmen gewährleistet wird (Springer et al 1984). Discoidin wird von den Zellen ausgeschieden (Barondes et al 1985) und dient vermutlich als Matrix, an die sich die Zellen heften können (Springer et al 1984). Ein Rezeptorprotein für Discoidin in der Zellmembran aggregierender Zellen wurde ebenfalls isoliert (Gabius et al 1985). Die Sequenz Gly-Arg-Gly-Asp in Discoidin scheint eine maßgebliche Rolle zu spielen, da Zugabe synthetischer Peptide mit dieser Sequenz geordnete Ströme während der Aggregation verhindern (Springer et al 1984). Dies erinnert an Fibronectin, ein Protein, das Zellmigration während der Embryogenese von Vertebraten beeinflusst. Auch Fibronectin enthält die Aminosäuresequenz Gly-Arg-Gly-Asp, die für dessen Bindung an Fibroblasten verantwortlich gemacht wurde (Pierschbacher and Ruoslahti 1984).

Mehr als über die Funktion ist hingegen über die genomische Organisation und Regulation der Discoidingene bekannt.

Discoidin I + II sind zwei tetramere Proteine mit Untereinheiten von 26.000 (Discoidin I) bzw. 24.000 (Discoidin II) Dalton (Rosen et al 1973, Simpson et al 1974, Frazier et al 1975). Discoidin I ist eine Mischung aus drei isoelektrischen Formen, die von drei verschiedenen Genen codiert werden (Poole et al 1981, Tsang et al 1981, Devine et al 1982). Discoidin II besitzt nur eine Form der Untereinheit und wird durch ein viertes Gen codiert. Alle vier Gene werden gemeinsam coreguliert.

Mithilfe einer Discoidin I-c-DNA, die mit allen drei Discoidin I-m-RNAs hybridisiert, konnte in Hs2 keines der drei Discoidin I-Transkripte nachgewiesen werden. Über die Transkription des Discoidin II-Gens kann keine Aussage gemacht werden, da die Discoidin I-cDNA nicht mit der Discoidin II m-RNA kreuzhybridisiert (Rowekamp et al 1980, Tsang et al 1981).

Durch Westernblotanalyse konnte jedoch gezeigt werden, daß sowohl Discoidin I- als auch Discoidin II-Protein in Hs2 synthetisiert werden, wenngleich auch in verminderter Menge. Eine Möglichkeit, diese Diskrepanz zwischen Northern- und Westernblots zu erklären, besteht in der Annahme einer sehr instabilen Hs2-Discoidin-m-RNA.

Der Menge einer bestimmten RNA ist abhängig von seiner Synthese- und Abbaurate. Die durchschnittliche Halbwertszeit aller mRNAs beträgt 4 Stunden, von einigen entwicklungsregulierten mRNAs wurde jedoch gezeigt, daß sie sehr viel kürzere Halbwertszeiten (20 - 25 min) besitzen (Margolskee and Lodish 1980). Nach Disaggregation von Aggregaten werden die entwicklungsregulierten mRNAs destabilisiert. Ihre Halbwertszeit beträgt dann nur noch 20 - 25 min im Gegensatz zu 4 Stunden in intakten Aggregaten (Mangiarotti et al 1982). Zugabe von cAMP zu disaggregierten Zellen stabilisiert die entwicklungsregulierten mRNAs (Mangiarotti et al 1983).

Über den Einfluß von cAMP auf die Abbaurate der Discoidin-m-RNA ist meines Wissens nichts bekannt. Da jedoch cAMP reprimierend auf die Discoidintranskriptionsrate wirkt (Williams et al 1980, Alexander and Shinnick 1985), erscheint es mir durchaus plausibel anzunehmen, daß cAMP auch zu einer Destabilisierung der Discoidin-m-RNA führt. In Hs2-Zellen könnte sowohl die Transkriptionsrate erniedrigt als auch die Abbaurate erhöht sein, was zu einem sehr niedrigen Discoidin-m-RNA-Spiegel führen würde, und die Schwierigkeit RNA zu isolieren erhöht.

Das Discoidinprotein hingegen ist sehr stabil (Bartles et al 1982) und kann selbst in späten Entwicklungsstadien nachgewiesen werden, wenn kein Discoidin mehr transkribiert wird.

In diesem Zusammenhang sei auch auf die Transkriptionsanalysen von Williams et al (1980) hingewiesen. In Zellen, die sehr früh in der Entwicklung exogenem cAMP ausgesetzt wurden, wurden run-on-Transkriptionsanalysen durchgeführt, und es konnte gezeigt werden, daß durch Zugabe von cAMP die Transkription des Discoidin-I-gens nicht vollständig unterdrückt, sondern die Rate nur erniedrigt wird. cAMP-behandelte Zellen zeigten nur noch 20 % Transkription im Vergleich mit unbehandelten Zellen. Trotz derart nachgewiesener Trans-

kription konnte auf Northernblots, durch Hybridisierung mit einem markierten c-DNA-Klon, keine discoidin I-spezifische mRNA nachgewiesen werden.

Mutanten, bei denen keine Discoidin-mRNA oder kein Discoidin-Protein gebildet wird, sind sehr wahrscheinlich in einem regulatorischen Element defekt, da eine Mutation in einem der Discoidinstrukturgene nur schwer dafür verantwortlich gemacht werden kann, daß auch die anderen Strukturgene nicht transkribiert werden. Zu dieser Schlußfolgerung gelangten auch Alexander et al (1983) bei ihrer Analyse von Mutanten, deren Level an Discoidin I-spezifischer mRNA und an Discoidin I + II-Protein weniger als 1 % des Wildtyplevels ausmachte. Die zugrundeliegende Mutation (dis+) wurde in einem regulatorischen Gen vermutet, das spezifisch nur für die Regulation der Discoidingene verantwortlich ist (Alexander and Shinnick 1985, Alexander et al 1986). Die Spezifität dieser Mutation wurde aus der Tatsache abgeleitet, daß alle anderen untersuchten Parameter in der Entwicklung von Mutante und Wildtyp gleich waren (2D-Gelanalysen pulsmarkierter Proteine zu verschiedenen Zeitpunkten der Entwicklung, Enzymbestimmungen).

Hs2 unterscheidet sich von diesen Mutanten im wesentlichen in zwei Punkten:

a. der Discoidinproteinspiegel ist nicht derart drastisch reduziert. Hs2 besitzt noch 20 % des Wildtypspiegel im Gegensatz zu etwa 1 % bei Alexander. Dies könnte man darin begründet sehen, daß in Hs2 ein regulatorisches Produkt nicht gänzlich defekt oder ausgefallen ist sondern nur ineffizienter (z.B. in bezug auf Transkriptionsinduktion) arbeitet.

b. Hs2 unterscheidet sich auch in mehreren anderen Punkten vom Wildtyp (Zelltypproportionen, frühzeitige Expression später Gene, erhöhte cAMP-Rezeptorzahl).

Daraus habe ich den Schluß gezogen, daß die Mutation in Hs2 nicht ein discoidinspezifisches Regulatorgen betrifft, sondern eher ein regulatorisches Gen, das sowohl an der Regulation der Discoidingene als auch an der Regulation anderer Gene beteiligt ist.

Die verminderte Discoidinexpression ist auch nicht auf einen generellen Defekt in der frühen Phase der Entwicklung zurückzuführen. Andere Marker der frühen Entwicklung werden exprimiert, wie z.B. die cAMP-spezifische Phosphodiesterase, die Adenylatcyclase, die cAMP-spezifischen Rezeptoren, die α -Mannosidase und die Gene I42 und M3. Die Expression von I42 und M3 zeigt in Wildtypzellen dieselbe zeitliche Kinetik wie Discoidin (Rowekamp and Firtel 1980). Aufgrund ihrer unterschiedlichen Regulation durch cAMP werden die drei Gene jedoch in zwei verschiedene Untergruppen eingeteilt. I42/M3 gehören zu der Klasse von Genen, deren Expression durch exogene Pulse von cAMP stimuliert, durch kontinuierlich hohe Gaben an cAMP hingegen reprimiert wird (Mann and Firtel 1987, Mehdy and Firtel 1985). Discoidin wird zwar ebenfalls durch hohe Konzentrationen an exogenem cAMP inhibiert, Pulse von cAMP haben jedoch keinen Einfluß auf die Expression (Mann and Firtel 1987, Mehdy and Firtel 1985). I42/M3 einerseits und Discoidin andererseits besitzen offensichtlich teils gemeinsame, teils unterschiedliche Komponenten des cAMP-Regulationssystems. Hs2-Zellen müssen in einer Komponente defekt sein, die nicht in das Regulationssystem von I42/M3 eingreift.

Expression zelltypspezifischer Gene

Die Expression verschiedener zelltypspezifischer Marker wurde ebenfalls untersucht. Als prespore-spezifische Marker dienten PL3, ein c-DNA-Klon, und MUD1, ein Antikörper gegen prespore-Zellen. Als prestalk-spezifischer Marker diente D11, ein c-DNA-Klon. Hs1 verhält sich bezüglich aller dreier Marker wie die in der Literatur beschriebenen NC4-Zellen. PL3-spezifische mRNA und MUD1-spezifisches Antigen tauchen erstmals nach tipbildung auf und werden maximal im Slugstadium exprimiert. D11 wird während der Aggregation leicht exprimiert und hat sein Maximum der Expression während des tipstadiums.

Die unterschiedlich lange Aggregationsphase bei Hs1 und Hs2 macht ein Vergleich beider Stämme schwierig. Wird tipbildung als Bezugspunkt genommen, so werden bei Hs2 alle drei Marker früher als bei Hs1 exprimiert. PL3 und MUD1 werden in stärkerem Ausmaß als bei Hs1 vor tipbildung exprimiert und erreichen ihr Maximum der Expression bereits während des

tipstadiums. D11-Expression ist bereits während der Aggregation, vor tipbildung, maximal.

Induktion postaggregativer Gene in aggregationskompetenten und aggregierenden Zellen'

Als experimentelles System, um Sensitivitätsänderungen "messen" zu können, habe ich die Induktion und Stabilisierung postaggregativer Genexpression mittels cAMP benutzt.

In aggregationskompetenten Zellen, die schnell geschüttelt werden und somit eine Bildung von Zellkontakten vermieden wird, können das prespore-spezifische Transkript PL3 und das prespore-spezifische Antigen MUD1 nur in Hs2, nicht in Hs1, mittels cAMP induziert werden.

Eine Induktion (in suspensionsgehungerten Zellen) oder Stabilisierung (in auf Agar gehungerten Zellen) von D11-Transkripten (prestalk-spezifisch) kann in Hs2-Zellen mittels geringerer cAMP-Konzentration erreicht werden als in Hs1-Zellen.

Die Induktion prespore-spezifischer Genexpression kann wesentlich erleichtert werden, wenn den Zellen ermöglicht wird Zellkontakte auszubilden. Dies kann z.B. durch langsames Schütteln erreicht werden (Mehdy et al 1983).

In langsam geschüttelten aggregierenden Hs1-Zellen können sowohl das PL3-spezifische Transkript als auch das MUD1-Antigen ab 3 μ M cAMP induziert werden.

Aggregierende Hs2-Zellen wurden ausgewählt, die sich nach morphologischen Gesichtspunkten etwa in demselben Entwicklungszustand befanden wie Hs1. Diese Zellen exprimieren jedoch bereits PL3 und scheinen somit doch (zumindest bezüglich PL3-Expression) schon weiter entwickelt zu sein.

Auch die D11-Expression in diesen aggregierenden Hs2-Zellen scheint in einem fortgeschrittenerem Stadium zu sein als in Hs1. Zwar exprimieren sowohl Hs1 als auch Hs2 zu Beginn des Experiments D11, jedoch verschwindet D11-Expression in Hs1, wenn Zellen 4 Stunden ohne cAMP-Zugabe geschüttelt werden. Die D11-Expression wird stabilisiert durch cAMP-Zugabe von $\geq 3 \mu$ M cAMP. In Hs2-Zellen ist die D11-Expression unabhängig von cAMP. Dies wurde von Oyama and Blumberg (1986b) als ein Merkmal für späte D11-Expression beschrieben.

MUD1 wird in Hs2 zu Beginn des Experiments noch nicht exprimiert und kann induziert werden. Sehr geringe Mengen an cAMP scheinen dafür ausreichend zu sein, da bereits mit Dibutyryl-cAMP alleine (ohne cAMP) eine Induktion erzielt werden kann. Dibutyryl-cAMP kann zu geringem Anteil mit cAMP verunreinigt sein, was eventuell ausreicht, um MUD1 zu induzieren, oder die geringe Menge Dibutyryl-cAMP, die an die cAMP-spezifischen Rezeptoren bindet, (10.000 fach verminderte Affinität, Oyama and Blumberg 1986a) ist ausreichend.

In Hs1-Zellen (1 Stunde alt) und Hs2-Zellen (6 Stunden alt), die aufgrund der Expression verschiedener Marker (PL3, D11, I42) als gleichwertig in ihrem Entwicklungsstatus angesehen wurden, konnte PL3-Expression in Hs2 mittels geringerer cAMP-Konzentration induziert werden. D11-Expression wurde bei derselben cAMP-Konzentration stabilisiert.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß in allen Fällen, in denen PL3-Expression induziert werden konnte, dies bei Hs2 mit geringerer cAMP-Konzentration erreicht wurde. Dies unterstützt die These, daß Hs2 sensitiver auf cAMP reagiert.

Die Regulation des D11-Gens unterscheidet sich von der des PL3-Gens. In den meisten meiner Versuche scheint die D11-Expression bei höheren cAMP-Konzentrationen inhibiert zu sein (siehe Fig. 30A, 35, 38, 39). Dies ist nicht auf geringere RNA-Mengen in den betreffenden Spuren zurückzuführen, wie z.B. in Fig. 35 sehr deutlich wird. Auf demselben Gel nimmt die Menge der PL3-Transkripte kontinuierlich zu, während die Menge der D11-Transkripte abnimmt.

Die Induktion der prestalk-Gene unterscheidet sich von der der prespore-Gene auch noch in anderen Punkten.

- prestalk-Gene können durch geringere Konzentrationen an cAMP induziert werden (Oyama and Blumberg 1986a, Haribabu and Dottin 1986, und eigene Beobachtungen).

- prestalk-Gene sind früher in der Entwicklung induzierbar als prespore-Gene (Oyama and Blumberg 1986b).

- prestalk-Gene ändern ihre Regulation bezüglich cAMP im Laufe der Entwicklung (Oyama and Blumberg 1986b).

- für die Induktion der prespore-Gene durch cAMP ist de novo Proteinsynthese nötig, nicht hingegen für die prestalk-Geninduktion (Mehdy et al 1983).

Dies läßt die Vermutung aufkommen, daß prestalk-Gene möglicherweise durch einen anderen Mechanismus reguliert werden als prespore-Gene.

Stabilisierung prespore-spezifischer Gene in disaggregierten Slugzellen

Da die Induzierbarkeit der prestalk- und prespore-spezifischen Gene entwicklungsreguliert ist (Oyama and Blumberg 1986b), und der zeitliche Ablauf der Entwicklung in Hs1 und Hs2 unterschiedlich lang ist, ist ein Vergleich zwischen Hs1- und Hs2-Stadien sehr schwierig.

Daher wurde auf das Slugstadium, ein eindeutig definiertes Stadium, ausgewichen.

Die Stabilisierung der Expression des prespore-spezifischen Gens PL3 wurde in disaggregierten Slugzellen beobachtet. Werden disaggregierte Slugzellen ohne Ausbildung von Zellkontakten geschüttelt, verlieren sie die PL3-Transkripte. In Hs1-Zellen kann dieser Verlust durch Zugabe von 3 μM cAMP verhindert werden. Bei Hs2-Zellen werden wesentlich höhere Konzentrationen benötigt (10 - $\geq$ 100 μM cAMP). Dies ist umso erstaunlicher, da eine Induktion des PL3-Gens bei undifferenzierten Hs2-Zellen bei geringeren cAMP-Konzentrationen erfolgt.

Es wurde gezeigt, daß die Menge cAMP, die benötigt wird um PL3-Expression zu stabilisieren, zellkonzentrationsabhängig ist. Höhere Zellkonzentrationen erfordern höhere Mengen cAMP für die Stabilisierung. Dies ist möglicherweise auf eine Konditionierung des Mediums mit einem inhibierenden Faktor (inhibierend in bezug auf prespore-Differenzierung) zurückzuführen. Zellen, die in Medium inkubiert werden, das zuvor von Zellen konditioniert wurde, zeigen keine Expression des PL3-Gens bei einer cAMP-Konzentration, bei der dieselben Zellen, die jedoch in frischem Medium inkubiert werden, eine Expression zeigen.

Sowohl Hs1- als auch Hs2-Zellen produzieren diesen Stoff, jedoch scheinen Hs2-Zellen sensitiver darauf zu reagieren. In einem Experiment, in dem Hs1- und Hs2-Zellen annäherungsweise im gleichen Medium geschüttelt wurden (Medienaustausch alle 30

min), kann wiederum Hs1-PL3-Expression bei geringerer cAMP-Konzentration stabilisiert werden als Hs2-PL3-Expression.

Die beschriebenen Induktions- und Stabilisierungsexperimente werfen mehrere Fragen auf.

1. Wie wird das extrazelluläre cAMP-Signal weitergeleitet?
2. Warum werden derart hohe Konzentrationen an cAMP benötigt?
3. Inwiefern unterscheiden sich Induktion und Stabilisierung von PL3?

1. Weiterleitung des cAMP-Signals

Als relativ gesichert gilt die Erkenntnis, daß der erste Schritt in der Weiterleitung eines extrazellulären cAMP-Signals in einer Bindung des cAMP an die cAMP-spezifischen Rezeptoren besteht (Schaap and van Driel 1985, Oyama and Blumberg 1986a, Haribabu and Dottin 1986, Gomer et al 1986a). Wie die Weiterleitung des Signals nach Bindung an die cAMP-Rezeptoren erfolgt, ist noch unklar. Eine Hypothese besteht in der Annahme, daß durch Bindung von cAMP an die Rezeptoren die Adenylatcyclase aktiviert wird, was wiederum zu einem Anstieg des intrazellulären cAMP-Spiegels führt. Eine Erhöhung des intrazellulären cAMPs könnte dann auf verschiedene Art und Weise, wie z.B. durch Aktivierung einer cAMP-abhängigen Proteinkinase (de Gunzburg and Veron 1982, Frame and Rutherford 1984, Majerfeld et al 1984, Schoen et al 1984) letztendlich zu einer Modulierung der Genexpression führen. Mehrere Befunde lassen sich mit dieser Vorstellung vereinbaren. Der intrazelluläre cAMP-Spiegel ist tatsächlich erhöht nach Abschluß der Aggregation (Pahlic and Rutherford 1979, Merkle et al 1984), wenn ein ganzer Satz neuer mRNAs (sog. späte Gene) synthetisiert wird, und die Expression der frühen Gene (z.B. I42, M3, Discoidin) eingestellt wird. Die Vermutung liegt nahe, daß eine Änderung des cAMP-Spiegels der Auslöser für das Ab- oder Anschalten von Genen im Laufe der Entwicklung ist. Werden Aggregate dissoziiert und als Einzelzellen gehalten, sinkt der cAMP-Spiegel, und gleichzeitig verlieren diese Zellen ihre späten Transkripte und reexprimieren frühe Transkripte (Berger et al 1985).

Zugabe von cAMP-Pulsen, was zu einer Aktivierung der Adenylatcyclase führt, führt zu einer frühzeitigen Expression einiger früher und später Gene.

All dies scheint für eine Beteiligung von intrazellulärem cAMP als second messenger zu sprechen. Neuere Versuche zwingen jedoch dazu diese Vorstellung zu revidieren. Eine Induktion früher und später Gene mittels cAMP kann auch unter Bedingungen, die eine Aktivierung der Adenylatcyclase verhindern, erzielt werden.

Koffein z.B. hemmt die Aktivierung der Adenylatcyclase in *Dictyostelium* (Brenner and Thoms 1984). Trotzdem führen cAMP-Stimuli in Gegenwart von Koffein zu einer Induktion früher und später Gene (Mann and Firtel 1987, Schlenz und Weijer, unveröffentlicht).

Eine Aktivierung der Adenylatcyclase kann auch durch Inkubation in Medium hoher Osmolarität verhindert werden (Darmon and Klein 1978). Unter solchen Bedingungen kann jedoch trotzdem die Expression postaggregativer Gene mittels cAMP induziert werden (Oyama and Blumberg 1986a).

Dies zeigt, daß nach Bindung von cAMP an die Rezeptoren nicht die Aktivierung der Adenylatcyclase, sondern ein anderer dadurch ausgelöster Schritt essentiell ist, wie z.B. eine Aktivierung der Guanylatcyclase, die durch Koffein nicht inhibiert wird (unveröffentlichte Beobachtung zitiert in Mann and Firtel 1987).

Eine Aktivierung der Adenylatcyclase und daraus resultierender Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration, ist offenbar nicht notwendig für die Induktion der Transkription.

2. Konzentrationsabhängigkeit der Induktion postaggregativer Differenzierung durch cAMP

Postaggregative Differenzierung kann nur durch sehr hohe Konzentrationen an cAMP induziert werden. Die Frage erhebt sich, wie sich dies mit den Dissoziationskonstanten der cAMP-Rezeptoren vereinbaren läßt. Die niedrigaffinen Rezeptoren zeigen eine Dissoziationskonstante von 0.2 - 0.3 μM in aggregierenden und Slugzellen (siehe Fig. 11 und 12). Die Mindestkonzentration an cAMP, mit der postaggregative Gene induziert oder stabilisiert werden konnten, war 3 μM . Bei 3 μM

cAMP sind bereits 94 % der niedrigaffinen Rezeptoren besetzt, trotzdem läßt sich eine deutliche Steigerung der Transkriptmenge beobachten, wenn die cAMP-Konzentration von 3 auf 5, 10 oder 100 μM gesteigert wird (siehe z.B. Fig. 35). Mehrere Erklärungsmöglichkeiten bieten sich an.

a. es muß tatsächlich ein sehr hoher Prozentsatz der Rezeptoren besetzt sein, um Genexpression zu induzieren, und die Zellen sind in der Lage, geringfügige Unterschiede im Prozentsatz besetzter Rezeptoren wahrzunehmen.

b. es existiert eine weitere Rezeptorklasse mit einer sehr hohen Dissoziationskonstanten. Mit der in dieser Arbeit angewandten Methode zur Bestimmung der cAMP-Bindungsaktivität wäre ein solcher Rezeptortyp allerdings nicht von der unspezifisch gemessenen Bindung zu unterscheiden gewesen. In der Tat behaupten Schaap and Spek (1984) bei ihren Messungen in Slugzellen einen Rezeptortyp mit einer K_d von etwa 1 μM entdeckt zu haben. Ein solcher Rezeptortyp wäre durchaus geeignet, um die benötigten hohen Konzentrationen an cAMP bei disaggregierten Slugzellen plausibel zu machen. Jedoch wurde bisher noch nie von einem derartig niedrigaffinen Rezeptortyp in undifferenzierten (aggregationskompetenten oder aggregierenden) Zellen berichtet.

c. aufgrund der Phosphodiesteraseaktivität der Zellen wird cAMP abgebaut, so daß die tatsächlich vorherrschende cAMP-Konzentration wesentlich geringer ist. Oyama et al (1986a) jedoch haben in ähnlichen Versuchen (auch Zugabe von 500 μM Dibutyryl-cAMP als Phosphodiesterase-Kompetitor) das verbliebene cAMP nach 2.5 Stunden Schütteln gemessen, und konnten zeigen, daß ab einer Konzentration von 1 - 3 μM cAMP nur ein sehr geringer Anteil abgebaut wird.

Slugzellen besitzen obendrein nur eine sehr geringe Phosphodiesteraseaktivität. Diese Aktivität steigt zwar an als Folge der Disaggregation in Einzelzellen, jedoch ist der Anstieg extrazellulärer Phosphodiesteraseaktivität gering, da in gleichem Maße auch Phosphodiesterase-Inhibitor sezerniert wird (Okamoto 1979).

d. die Dissoziationskonstante des Rezeptors wird durch die Gegenwart eines kompetitiven Inhibitors erhöht.

Es ist z.B. bekannt, daß Adenosin die Bindung von cAMP an die cAMP-Rezeptoren inhibiert (Newell and Ross 1982b, van Haastert 1983, Theibert and Devreotes 1984). Es wird vermutet, daß dies die Ursache ist für die beobachtete Inhibierung des cAMP-relays (Theibert and Devreotes 1984) und der Chemotaxis (van Haastert 1983) durch Adenosin. Adenosin inhibiert ebenfalls die Induktion postaggregativer Differenzierung durch cAMP (Schaap and Wang 1986). Dies wurde anhand der Expression zweier Marker (MUD1, Ornithindecarboxylase) bestimmt. Normalerweise erfolgt halbmaximale Induktion durch cAMP bei 50 μM cAMP ($= K_a$). Durch Zugabe von Adenosin wird der K_a -Wert erhöht. Der K_i -Wert für die Inhibition der Induktion durch Adenosin liegt bei etwa 200 μM .

Die Frage stellt sich, ob Adenosin in vivo tatsächlich eine Rolle spielt. Dazu sei bemerkt, daß *Dictyostelium*-zellen eigene Adenosinrezeptoren mit Dissoziationskonstanten von 350 μM und 0.8 μM besitzen (Newell 1982, Newell and Ross 1982b, van Haastert 1983). Die relativ hohen Dissoziationskonstanten lassen vermuten, daß tatsächlich hohe Konzentrationen von Adenosin in vivo vorkommen.

Auf das Vorhandensein von endogenem Adenosin in slugs wurde nach Behandlung mit Adenosindeaminase geschlossen. Dieses Adenosin abbauende Enzym führt zur Bildung von prespore-Vakuolen im anterioren Gewebe (Schaap and Wang 1986). Dies führte die Autoren zu der Hypothese, daß Adenosin hauptsächlich im anterioren Teil gebildet wird und eine Differenzierung zu prespore-Zellen dort verhindert. Adenosin wird als einer der wesentlichen Faktoren angesehen, die an der Bildung oder Aufrechterhaltung des prestalk/prespore-Musters beteiligt sind.

Ein weiterer Faktor der cAMP-induzierte Differenzierung inhibiert, ist DIF (Wang et al 1986). DIF scheint unter bestimmten Umständen ebenfalls die Affinität der cAMP-Rezeptoren für cAMP zu erniedrigen (Wang et al 1986).

3. Unterschied zwischen Induktion und Stabilisierung von PL3-Transkripten

Induktion und Stabilisierung der PL3-Transkription wurde in zwei verschiedenen Entwicklungsstadien gemessen. In aggregationskompetenten Zellen kann PL3-Expression in Hs2 mittels geringerer cAMP-Konzentration induziert werden als in Hs1. In Slugzellen kann PL3-Expression nur mit höheren cAMP-Konzentrationen als in Hs1 stabilisiert werden.

Kürzlich veröffentlichte Untersuchungen von Bozzone and Berger (1987) lassen die Autoren zu dem Schluß kommen, daß frühe und späte Entwicklungsstadien zwei verschiedene Zustände darstellen, die durch cAMP unterschiedlich reguliert werden. Die Fähigkeit verschiedener cAMP-Analoga PL3-Expression zu induzieren, ist ein Hauptfaktor der diese These unterstützt. Zellen in frühen Entwicklungsstadien (aggregationskompetent) können mit 8-Bromo-cAMP nicht stimuliert werden PL3-Gene zu exprimieren (siehe auch Oyama and Blumberg 1986a, Schaap and van Driel 1985, Haribabu and Dottin 1986). In disaggregierten Slugzellen, die 5 Stunden in disaggregiertem Zustand belassen wurden, und auf diese Weise ihre PL3-Transkripte nahezu vollständig verloren haben, kann das PL3-Gen sowohl durch Zugabe von cAMP als auch 8-Bromo-cAMP reexprimiert werden (Bozzone and Berger 1987). 8-Bromo-cAMP hat nur eine sehr geringe Affinität für die cAMP-spezifischen membrangebundenen Rezeptoren, jedoch eine hohe Affinität für die intrazellulär lokalisierte cAMP-abhängige Proteinkinase. Dies wirft die Möglichkeit auf, daß PL3-Expression in disaggregierten Slugzellen und in aggregationskompetenten Zellen durch verschiedene Mechanismen reguliert wird.

Auch von anderen Genen wurde bereits gezeigt, daß die Art und Weise ihrer Regulation sich im Laufe der Entwicklung ändert. So ist in frühen Entwicklungsstadien die Expression des D11-Gens durch cAMP stimulierbar, in späteren Entwicklungsstadien (z.B. Slugs) ist D11-Expression unabhängig von cAMP-Zugabe (Oyama and Blumberg 1986b). Ein anderes Beispiel ist D2, ein Vertreter der prespore I-Gene. In frühen Entwicklungsstadien wirkt cAMP leicht inhibierend, in späten Entwicklungsstadien stimulierend auf dessen Expression (Oyama and Blumberg 1986b).

Beobachtungen von Bozzone und Berger (1987) führten außerdem zur Entdeckung einer weiteren Eigentümlichkeit disaggregierter

Slugzellen. Sie konnten zeigen, daß Slugzellen, die disaggregiert werden, ihre PL3-Transkripte immer verlieren, mit oder ohne Zugabe von cAMP. In Gegenwart von cAMP erfolgt dann eine Reexprimierung nach 4 Stunden.

Unter diesem Aspekt betrachtet, ist die Behauptung, cAMP stabilisiere prespore-Genexpression in disaggregierten Zellen, eventuell eine Fehlinterpretation. Die Autoren argumentieren, daß die Fähigkeit auf cAMP zu reagieren in frisch dissoziierten slugzellen nicht vorhanden ist, sondern erst (z.B. durch 4 Stunden Schütteln) erworben werden muß.

Möglicherweise sind neben cAMP noch andere Faktoren für die Aufrechterhaltung der PL3-Expression in vivo erforderlich. Diese Faktoren könnten z.B. durch Disaggregation, Waschen und Filtrieren verloren gehen und müssen erst wieder langsam reakkumuliert werden.

Es gibt zwei Möglichkeiten, die Ergebnisse meiner Versuche mit disaggregierten Slugzellen zu erklären.

1. Hs1- und Hs2-Zellen könnten sich in der zeitlichen Kinetik, mit der diese Fähigkeit auf cAMP zu reagieren erworben wird, unterscheiden. Die höhere cAMP-Konzentration, die bei Hs2 benötigt wird um PL3 zu "reexprimieren", könnte einfach bedeuten, daß Hs2 die Fähigkeit durch cAMP stimuliert werden zu können, noch nicht vollständig erworben hat. Die leicht unterschiedlichen Ergebnisse bezüglich der benötigten cAMP-Konzentrationen in vier verschiedenen, unabhängigen Experimenten könnten auf eine Variabilität der Kinetik bei Hs2 zurückzuführen sein. Mit dieser Annahme alleine läßt sich jedoch nicht die Zellkonzentrationsabhängigkeit der Induzierbarkeit und die nachgewiesene Konditionierung des Mediums erklären. Dies würde zusätzliche Annahmen über Sekretions- und Abbauraten zusätzlich produzierter Faktoren erfordern.

2. Die Induktion der PL3-Genexpression in aggregations-kompetenten und disaggregierten Slugzellen durch cAMP werden durch zwei unterschiedliche Mechanismen ermöglicht, und Hs2 reagiert sensitiver auf cAMP im ersten Fall (frühe

Entwicklungsstadien) und weniger sensitiv im zweiten Fall (disaggregierte Slugzellen).

Das zweite System (Reexprimierung oder Stabilisierung in disaggregierten Slugzellen) ist eine künstlich herbeigeführte Situation, die sich möglicherweise von den in vivo Verhältnissen im Slug unterscheidet, und somit nicht unbedingt als Evidenz für oder gegen eine postulierte Sensitivitätsänderung bezüglich cAMP herangezogen werden kann.

Unterschied zwischen dem experimentellen und dem in vivo Slug-System

Slugzellen, die in disaggregiertem Zustand geschüttelt werden, unterscheiden sich in mehreren Punkten von den in vivo-Slugzellen.

- disaggregierte Slugzellen werden durch schnelles Schütteln und Zugabe von 10 mM EDTA daran gehindert Zellkontakte auszubilden. Die Ausbildung von Zellkontakten wurde jedoch von vielen Autoren als ein Hauptfaktor betrachtet, der an der in vivo Exprimierung später Gene beteiligt ist (Barklis and Lodish 1983, Mehdy et al 1983, Chisholm et al 1984).

- Es wird im allgemeinen angenommen, daß Zugabe von cAMP zu disaggregierten Slugzellen als Ersatz für den Verlust von Zellkontakten dient. Für die kontinuierliche Synthese vieler später Proteine ist die Aufrechterhaltung von Zellkontakten nötig (Alton and Lodish 1977, Landfear and Lodish 1980). Nach Disaggregation stoppt die Synthese dieser Proteine, was jedoch in den meisten Fällen durch cAMP-Zugabe verhindert werden kann. Jedoch gibt es einige Proteine, die nach Disaggregation, auch in Gegenwart von cAMP, nicht mehr synthetisiert werden (Landfear and Lodish 1980). Auch einige Enzyme, deren Aktivität nach Disaggregation zu- oder abnimmt, bleiben durch cAMP unbeeinflusst (Takemoto et al 1978, Rickenberg et al 1977).

- Nach Abschluß der Aggregation ist der intrazelluläre cAMP-Spiegel relativ hoch und bleibt auf diesem Niveau bis zur Fruchtkörperbildung (Brenner 1978, Pahlic and Rutherford

1979). Werden Zellen disaggregiert, sinkt der intrazelluläre cAMP-Spiegel rapide ab (Finney et al 1981, Berger et al 1985). Der intrazelluläre cAMP-Spiegel in disaggregierten Zellen, nach Zugabe von extrazellulärem cAMP, wurde meines Wissens bisher noch nicht gemessen. Es besteht durchaus die Möglichkeit, daß die intrazelluläre cAMP-Konzentration in disaggregierten Slugzellen niedrig bleibt, auch nach Zugabe von exogenem cAMP. Exogenes cAMP kann nicht einfach in die Zellen diffundieren, so daß eine Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels über eine Aktivierung der Adenylatcyclase zustandekommen müßte. Allerdings ist bekannt, daß unter Bedingungen, unter denen die Adenylatcyclase inhibiert ist, exogenes cAMP trotzdem zu einer Induktion von Genexpression führt. Exogenes cAMP scheint also nicht über eine Aktivierung der Adenylatcyclase den intrazellulären cAMP-Spiegel zu erhöhen. Somit unterscheiden sich disaggregierte Slugzellen von in vivo Slugzellen möglicherweise in ihrem Gehalt an intrazellulärem cAMP.

Derartige Unterschiede könnten z.B. dazu führen, daß disaggregierte Slugzellen durch cAMP anders reguliert werden als in vivo Slugzellen.

Unterschied zu anderen cAMP-induzierten Reaktionen

Die Induktion postaggregativer Differenzierung unterscheidet sich von anderen cAMP-induzierten Reaktionen, wie z.B. die vorübergehende Erhöhung des cGMP-Spiegels, relay oder die Erlangung von Aggregationskompetenz, sowohl in der Menge an cAMP als auch in der Art der Applikation. Letztere Reaktionen können mittels sehr viel geringerer cAMP-Konzentration (10^{-10} bis 10^{-7} M) induziert werden. Essentiell ist dabei, daß cAMP in Form von Pulsen (in 6 min Intervallen) zugegeben wird, da die Zellen nur auf eine Erhöhung der cAMP-Konzentration reagieren. Wird der extrazelluläre cAMP-Spiegel konstant gehalten, adaptieren sie (Dinauer et al 1980b, van Haastert and van Heijden 1983). Postaggregative Differenzierung kann, wie bereits mehrfach erwähnt, nur mithilfe hoher cAMP-Konzentrationen induziert werden. Dabei ist es unerheblich, ob dies in Form von Pulsen geschieht, oder ob kontinuierlich cAMP

zugegeben wird. Ausschlaggebend ist alleine die Gesamtmenge cAMP, die in einem bestimmten Zeitintervall vorhanden ist, d.h. die Zellen zeigen keine Adaptation (Schaap and van Driel 1985).

Offenbar existieren zwei verschiedene Wirkungsmechanismen von cAMP. Zu den nur durch cAMP-Pulse stimulierbaren Markern gehören u. a. die Adenylatcyclase, die Phosphodiesterase und die cAMP-Rezeptoren. Zu den nur durch kontinuierliche cAMP-Gaben stimulierbaren Markern gehören die späten, prespore- und prestalk-spezifischen Gene. Discoidin I-Transkription wird durch kontinuierliche cAMP-Zugabe reprimiert.

Interessant ist die zeitliche Regulation dieser Marker in Hs1 und Hs2. Die nur durch cAMP-Pulse stimulierbaren Enzyme werden in beiden Stämmen relativ zur gleichen Zeit und in gleichem Ausmaß synthetisiert, wenn z.B. tipbildung als gemeinsamer Bezugspunkt benutzt wird. Auf derselben zeitlichen Skala betrachtet, erscheinen jedoch PL3 und MUD1 (prespore-spezifisch) und D11 (prestalk-spezifisch) in Hs2 früher als in Hs1. Discoidin I wird in Hs2 nur in sehr verringertem Maße exprimiert.

Dies unterstützt die Anschauung, daß es zwei Gruppen von Genen gibt, die unterschiedlich durch cAMP reguliert werden, und Hs2 sehr wahrscheinlich nicht in einem Gen mutiert ist, das in die Regulation der ersten Gruppe (durch cAMP-Pulse stimulierbar) eingreift, sondern in einem Gen, das die Regulation der zweiten Gruppe (kontinuierliche cAMP-Stimulation) betrifft.

Da hohe Konzentrationen an cAMP benötigt werden, um die Gene der zweiten Gruppe zu regulieren, sind sehr wahrscheinlich die niedrigaffinen cAMP-Rezeptoren an der Weiterleitung des cAMP-Signals beteiligt. Die Anzahl dieser Rezeptoren ist in Hs2 erhöht, was dazu führen könnte, daß Hs2-Zellen sensitiver auf kontinuierliche cAMP-Gaben reagieren.

Material und Methoden

Abkürzungen:

DDT	Dithiothreitol
DEP	Diethylpyrocarbonate
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
Hepes	N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-ethanesulfonic acid
KK ₂	KH ₂ PO ₄ /K ₂ HPO ₄
MES	2-(N-morpholino)-ethanesulfonic acid
MOPS	Morpholinopropanesulfonic acid
NP-40	Nonidet P40
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine

1. Wachstum der Zellen

*Dictyostelium*zellen werden zusammen mit *Klebsiella aerogenes* auf SM/2-Platten gezüchtet (Sussman 1966) und 1x pro Woche umgeklont. Um größere Mengen *Dictyostelium*zellen zu erhalten, werden sie in Suspensionskultur, zusammen mit *Klebsiella aerogenes*, in 50 mM KK₂, pH 6.2, gezüchtet.

SM/2-Platten	5	gr Bactopecton
	5	gr Glucose
	0.5	gr Hefeextrakt
	1	gr MgSO ₄
	2.2	gr KH ₂ PO ₄
	1	gr K ₂ HPO ₄
	15	gr Bactopecton
	auf 1 l Wasser auffüllen	

2. Differenzierung der Zellen

Um die Differenzierung einzuleiten, werden die Zellen vom Bakterienmedium durch dreimaliges Waschen mit KK₂ (20 mM, pH 6.8) befreit und auf nährstofflose Agarplatten ausplattiert. Dazu dienen entweder Wasseragarplatten (1 % Agar in H₂O dest.) oder Salzplatten (1 % Agar in 13 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 1.6 mM MnCl₂, 4 mM KK₂, pH 6.0, Newell and Ross 1982b). Die Zellen werden nach dem Waschen auf 2-4 x 10⁷ Zellen/ml mit KK₂ konzentriert, davon 5 ml auf die Agarplatten (9 cm ø) gegossen (= 1-2 x 10⁸ Zellen/Platte) und 30 min bei Raumtemperatur stehengelassen. In dieser Zeit setzen sich die Zellen ab, und der Überstand kann dann abgegossen werden. Ein gutes Absetzen der Zellen wird nur dann erreicht, wenn die Zellen sich zum Zeitpunkt der Ernte bereits in der stationären Wachstumsphase befinden, d.h. die Bakterien nahezu vollständig aufgebraucht sind. Die Zellen bilden dann bereits Membranmoleküle, mit

denen sie an Oberflächen zu haften vermögen. Nach dem Abgießen des Überstands werden die Platten noch etwa 10 min offen stehengelassen, um sie etwas zu trocknen, anschließend werden sie, je nach Versuchsbedingungen, bei 4°C oder 22°C inkubiert. Bei Versuchsserien, bei denen verschiedene Entwicklungsstadien getestet wurden, wurde folgendermaßen vorgegangen. Die Zellen wurden, wie eben beschrieben, auf Salzplatten ausplattiert, dann 12 Stunden bei 4°C und anschließend bei 22°C inkubiert. Die Inkubation bei 4°C führt dazu, daß die Zellen Aggregations-kompetenz erlangen, d.h. sie exprimieren bereits viele frühe Gene, wie z.B. die Komponenten für das Chemotaxisssystem, sie haben jedoch noch nicht aggregiert. Die Aggregation beginnt dann nach dem Transfer in 22°C. Diese Methode hat den Vorteil, daß die Differenzierung bei 22°C nun äußerst synchron abläuft, d.h. alle Zellen auf einer Platte befinden sich im gleichen Entwicklungsstadium. Werden die Zellen gleich bei 22°C inkubiert, läuft die Entwicklung oft sehr asynchron ab, z.B. können auf einer Hälfte der Platte Zellen bereits tips bilden, während sie auf der anderen Hälfte derselben Platte gerade erst zu aggregieren beginnen. Dies erschwert natürlich die Sammlung definierter Entwicklungsstadien.

3. Enzymatische Bestimmungen

3.1. cAMP-Bestimmung

cAMP-Konzentrationsbestimmungen wurden mithilfe eines kommerziell erhältlichen kits (cAMP (^3H)-Radioassay kit, Amersham, Bestellnummer TRK.432) durchgeführt. Der kit enthält ein Bindungsprotein mit hoher Affinität für cAMP, 8- ^3H -cAMP (27 Ci/mmol), kalte cAMP-Standards und Aktivkohle. Der Test basiert auf der kompetitiven Bindung von unmarkiertem cAMP (aus der zu messenden Probe) und einer definierten Menge an tritiummarkiertem cAMP (wird zugegeben) an einem cAMP-spezifischen Bindungsprotein. Der Anteil des proteingebundenen radioaktiven cAMP ist der Konzentration an nichtmarkiertem cAMP umgekehrt proportional. Der Nachweis läuft im einzelnen folgendermaßen ab: 5-8 x 10⁶ Zellen werden pelletiert, durch Zugabe von 30 µl Perchlorsäure (3.5 % v/v) lysiert und entweder sofort weiterbehandelt oder bei -80°C eingefroren. Das Lysat wird dann durch Zugabe von 15 µl KHCO₃ (50 % gesättigt) neutralisiert. Zellfragmente werden abzentrifugiert (1 min, 8000 g), und zu 20 µl des Überstandes werden 20 µl 8- ^3H -cAMP und 40 µl Bindungsproteinlösung zugegeben, kurz gevortext und 2 - 18 hr auf Eis inkubiert. Anschließend werden 50 µl Aktivkohleadsorbens zugegeben und 1 min auf Eis inkubiert. Nichtgebundenes cAMP adsorbiert an die Aktivkohle und kann vom proteingebundenen Anteil (im Überstand) abzentrifugiert werden (1 min, 8000 g). 100 µl des Überstandes werden in 3 ml Szintillationsflüssigkeit aufgenommen, und die

Radioaktivität im Szintillationszähler bestimmt. Unter Verwendung der mitgelieferten cAMP-Standards wird eine Eichkurve erstellt, aus der dann der cAMP-Gehalt der Probe ermittelt werden kann.

3.2. Adenylatcyclaseassay

Die Bestimmung der Adenylatcyclaseaktivität erfolgte im wesentlichen nach Salomon et al (1974).

Die Zellen werden gewaschen und auf 6×10^7 /ml in HB-Puffer resuspendiert. Die Zellen werden lysiert, indem sie bei -70°C eingefroren und dann wieder aufgetaut werden. Für den assay selbst werden 2×10^6 Zellen benutzt. Zu 30 μl Zelllysat werden 20 μl Reaktionscocktail, 10 μl 20 mM MnCl_2 und 40 μl Wasser gegeben und 10 min bei 24°C inkubiert. Anschließend wird das Reaktionsgemisch auf Eis gestellt, 100 μl Stopplösung und 50 μl ^3H -cAMP (0.35 mCi/ml) zugegeben. Die Proben werden dann 3 min gekocht, um die Proteine vollständig zu denaturieren. Um das produzierte radioaktive cAMP vom zugegebenen radioaktiven ATP abzutrennen, wird eine Kombination aus Dowex- und Aluminiumsäulen benutzt. 1 ml Wasser wird zu den Proben gegeben, und diese dann über 1 ml Dowexsäulen gekippt (Biorad, Dowex AG 50 W-X4, 200 - 400 mesh). Durch Zugabe von 2 ml Wasser wird ATP eluiert. Mit weiteren 4 ml Wasser kann cAMP eluiert werden. Das Eluat wird über Aluminiumsäulen getropft (Sigma, Alumina for chromatography, Type WN-3, neutral), und mit 1 ml Imidazol (0.1 M, pH 7.4) wird das restliche ATP eluiert. Durch anschließende Zugabe von 4 ml Imidazol läuft cAMP durch und wird in Szintillationsgefäßen aufgefangen und gezählt.

Das Verhältnis von zugegebenem zu eluiertem ^3H -cAMP wird berechnet und gibt die Wiedergewinnungsrate jeder einzelnen Säule an.

HB-Puffer: 10 mM Tris-HCl, pH 8.0
 200 mM Saccharose
 1 mM EDTA
 1 mM DTT
 5 mM Benzamidin

Reaktionscocktail: 50 mM Tris-HCl, pH 8.0
 20 mM Creatinphosphat
 10 mM DTT
 1 mM ATP
 $1-2 \times 10^6$ cpm ^{32}P -ATP (NEN, 59 Ci/mmol)
 1 mgr/ml Creatinkinase

Stopplösung: 1 % SDS
 40 mM ATP
 1.2 M cAMP, pH 7.5

3.3. cAMP-relay (nach van Haastert 1984)

Zellen werden in 10 mM K_2HPO_4/Na_2HPO_4 , pH 6.5, gewaschen, auf 6×10^7 /ml konzentriert, und 5-10 min vorsichtig Luft durch die Zellsuspension geblasen. Zu 30 μ l Zellen wird 3 μ l 50 μ M 2'-Deoxyadenosine 3',5'-monophosphat (enthält außerdem 50 mM DTT) zugegeben und 3 min geschüttelt. Anschließend wird 30 μ l Perchlorsäure (3.5 % v/v) zugegeben, um die Zellen zu lysieren, und 15 μ l 50 % gesättigtes $KHCO_3$, um das Lysat zu neutralisieren. Bei der Neutralisationsreaktion entsteht CO_2 , das entweicht. Die Membranfragmente werden abzentrifugiert (1 min, 8000 g), und der cAMP-Gehalt des Überstandes wird gemessen (siehe Punkt 3.1.).

Der Nullwert wird ermittelt, indem Stimulus und Perchlorsäure gleichzeitig zugegeben werden.

3.4. cAMP-Bindungsassay

Zellen werden pelletiert und mit KK_2 -Puffer (50 mM, pH 6.2) und 10 mM DTT (als Phosphodiesteraseinhibitor) auf etwa 1×10^8 Zellen/ml konzentriert. Der assay wird dann mit etwa 1×10^7 Zellen durchgeführt. Kaltes cAMP (0.1 - 1000 nM), und 60.000 cpm 3H -markiertes cAMP (Amersham 41 Ci/mmol) werden zugegeben, kurz gevortext und 2 min auf Eis inkubiert. Zu 120 μ l Reaktionsgemisch wird 1 ml gesättigtes Ammoniumsulfat und 100 μ l 1 %iges BSA als carrierprotein zugegeben und erneut 5 min auf Eis inkubiert. Danach wird 3 min bei 12.000 g zentrifugiert, der Überstand abgesaugt, das Pellet in 100 μ l 0.1 N Essigsäure aufgenommen und in 3 ml Szintillationslösung gezählt. Eine Korrektur für unspezifische Bindung wurde vorgenommen, indem der assay mit 10^{-4} M cAMP durchgeführt wurde. Sämtliche Bindungsstellen sind nun fast ausschließlich mit kaltem cAMP abgesättigt, die gemessene Radioaktivität im Zellpellet beruht auf unspezifischen Einschluß von 3H -markiertem cAMP in das Zellpellet.

3.5. Phosphodiesterase-assay

Die Theorie des assays (Thompson et al 1974) besteht im wesentlichen darin, daß 5'AMP, das durch Hydrolyse von cAMP durch die Phosphodiesterase entstanden ist, durch Zugabe von genügend Nucleotidase vollständig zu Adenosin abgebaut wird, welches wiederum vom geladenen Substrat durch Präzipitation mit einem Anionenaustauscher getrennt werden kann.

Zellen werden pelletiert, bei $-20^\circ C$ eingefroren, wieder aufgetaut, und in 100 mM Tricinepuffer pH 7.5 (enthält außerdem 20 % Glycerin und 1 % Triton-X-100) in einer Konzentration von $3-5 \times 10^7$ /ml aufgenommen (Lyse der Zellen). Zu 35 μ l Zellen werden 15 μ l Kobraschlangengift (= Nucleotidase 1 mgr/ml, Sigma Nr.V-0376) und 50 μ l cAMP-Lösung,

gelöst in 100 mM Tricine pH 7.5 (+ 20 % Glycerol, 1 % Triton-X-100, 25 mM MgSO_4) in verschiedenen Konzentrationen (siehe jeweilige Versuchsbeschreibung) zugegeben. Die cAMP-Lösung enthält 40.000 cpm 2,8,- ^3H -3'5'cAMP (Amersham TRK.498, 41 Ci/mmol). Diese Mischung wird 20 - 60 min bei 35°C inkubiert. Gestoppt wird die Reaktion durch Zugabe von 1 ml Dowex AG1-X2 (1:1 mit Wasser verdünnt, vorher mehrmals mit HCl und NaOH gewaschen). Die Lösung wird kurz vermischt, 30 min bei Raumtemperatur stehengelassen, und dann wird das Präzipitat 1 min in der Eppendorffzentrifuge abzentrifugiert. 300 μl des Überstands werden in 3 ml Szintillationslösung pipettiert und im Szintillationszähler gemessen. Der Nullwert wurde durch Zugabe von 35 μl Puffer anstatt Zellen ermittelt.

3.6. α -Mannosidase-assay

2-5 $\times 10^6$ Zellen werden pelletiert, bei -70°C eingefroren, aufgetaut, und in 250 μl Wasser aufgenommen und durch Ultraschall soniciert. 250 μl 1 mM p-Nitrophenyl-mannopyranoside und 25 μl 1 mM Acetatpuffer (pH 5.0) werden zugegeben und 30 min bei 35°C inkubiert. Die Reaktion wird gestoppt durch Zugabe von 500 μl 1 M NaCO_3 . Die Menge des abgespaltenen Nitrophenols kann durch Absorptionsmessung bei 420 nm bestimmt werden (Vergleich mit vorher erstellter Eichkurve). 1 Unit ist die Enzymaktivität, die 1 mM Nitrophenol/min abspaltet.

4. RNA-Analysen

4.1. Isolierung von RNA

RNA-Isolierung erfolgt aus gefrorenen (-70°C) Zellpellets. Die Zellpellets werden auf Eis in 0.3 ml Hepespuffer (50 mM, pH 7.5) mit 0.05 % SDS und 1 % DEP aufgenommen. 0.3 ml Phenol (gesättigt mit 1 M Tris, pH 8.0) wird zugegeben und 1 min kräftig auf dem Vortex gemischt. Danach wird 0.3 ml einer Chloroform/Isoamylalkohol-Mischung (25:1) zugegeben und erneut 1 min gevortext. Die Phasentrennung erfolgt durch 5-minütiges Zentrifugieren bei 12.000 g. Die wässrige Phase wird in ein frisches Röhrchen überführt und noch zweimal mit Phenol/Chloroform extrahiert. Zuletzt wird die wässrige Phase mit dem 3-fachen Volumen an 100 % Äthanol (Ethanol zur Synthese, Merck 818760) und 0.2 N Natriumacetat, pH 5.2, bei -20°C mindestens 1 hr lang gefällt. Das Präzipitat wird 10 min bei 12.000 g abzentrifugiert, in 70 % Äthanol gewaschen, erneut 10 min abzentrifugiert, im Exsikator oder an der Luft getrocknet und in 50 - 100 μl DEP-Wasser aufgenommen. 5 μl werden entnommen, in 1 ml Wasser verdünnt, und die optische Dichte bei 260 nm und 280 nm bestimmt. Eine OD von 1 bei 260 nm entspricht 40 μg RNA. Ist die RNA-Präparation frei von

Proteinen und sonstigen Verunreinigungen, ist $OD_{260}/OD_{280} = 2.0$. Die RNA-Präparationen werden bei -20°C aufbewahrt. Bei RNA-Isolierungen ist äußerste Vorsicht geboten, da RNase ein häufig vorkommendes und sehr stabiles Protein ist. Um Kontaminationen mit RNase zu vermeiden, wird ausschließlich mit Handschuhen gearbeitet, und sämtliche Lösungen werden mit 0.1 % DEP versetzt. DEP denaturiert Proteine und zerfällt beim Autoklavieren in CO_2 und Wasser.

4.2. Auftrennung der RNA durch Gelelektrophorese

10 - 20 μg RNA werden in 50 % Formamid, 6 % Formaldehyd und 1x Gelpuffer aufgenommen und 15 min bei 60°C denaturiert. Danach werden die Proben sofort auf Eis abgekühlt, und 0.04 % Bromphenolblau zugegeben. Die Proben werden auf ein denaturierendes Formaldehydgel aufgetragen, und die Elektrophorese bei 50 Volt 4-5 Stunden lang durchgeführt.

RNA-Gel:	1.2 % Agarose
	6 % Formaldehyd
	1x Gelpuffer
Gelpuffer:	20 mM MOPS
1x	5 mM Natriumacetat
	1 mM EDTA
	pH 8.0
Laufpuffer	20 mM MOPS
1x	5 mM Natriumacetat
	1 mM EDTA
	pH 7.0

4.3. Transfer der RNA-Moleküle (Northern blotting)

Der Transfer von RNA aus dem Gel auf andere Trägermembranen erfolgt im wesentlichen nach Southern (1975). Nach Beendigung der Elektrophorese wird das Gel 1 min in DEP-Wasser und anschließend 1 min in 20 x SSC gewaschen. Der Transfer erfolgt nur in Gegenwart hoher Salzkonzentrationen. Dazu wird über einen Ständer ein saugfähiges Tuch gebreitet, dessen Enden in eine 10-20 x SSC-Lösung tauchen. Darauf wird eine Schicht Filterpapier (Whatman 3M) und das Gel gelegt. Auf das Gel wird Nitrocellulose (Schleicher und Schüll) oder Genescreen (NEN) luftblasenfrei aufgelegt, und darauf mehrere Lagen Küchenpapier geschichtet. Dieser Stapel wird zusätzlich durch ein Gewicht beschwert. Durch Kapillarkräfte steigt die SSC-Lösung durch das Gel in die trockenen Papierschichten und nimmt dabei die RNA-Fragmente mit. Diese werden dann in der Nitrocellulose oder Genescreen immobilisiert. Der Transfer auf Nitrocellulose erfolgt in 20 x SSC, auf Genescreen in 10 x SSC

(1 x SSC = 0.15 M NaCl, 0.015 M Natriumcitrat, pH 7.0), und wird über Nacht durchgeführt.

Nach Beendigung des Transfers werden die Filter 1 min in 6 x SSC gewaschen, luftgetrocknet und dann 2 hr bei 80°C gebacken. Da der Transfer meist nie ganz vollständig ist, kann das Gel nach dem Blotting mit Acridin angefärbt werden. Die ribosomalen Banden werden dabei sichtbar und können als Molekulargewichtsmarker benutzt werden (28S-rRNA entspricht 4.2 kbp, die 18S-rRNA entspricht 1.9 kbp). Das Färben des Gels dient gleichzeitig dazu sicherzustellen, daß äquivalente Mengen RNA auf jede Spur aufgetragen wurde.

4.4. Nicktranslation der cDNA-Proben (Rigby et al 1977)

Nicktranslationen wurden mithilfe eines Nicktranslationskits von BRL (Bestellnummer 8160SB) nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Der Kit enthält eine Mischung aus DNAase I und DNA-Polymerase I, die zusammen mit 1 µg der zu markierenden DNA, mit einem kalten Nukleotidgemisch (0.2 mM dCTP/dGTP/dTTP, ebenfalls mitgeliefert), und 50 µCi $\alpha^{32}\text{P}$ -dATP (3000 Ci/mMol, Amersham) 1 hr bei 15°C inkubiert werden. Nach Stoppen der Reaktion mit 30 mM EDTA wird die DNA mit dem dreifachen Volumen Äthanol und 0.2 M Natriumacetat 1 hr bei -20°C gefällt. Das DNA-Präzipitat wird abzentrifugiert (10 min, 12.000 g), getrocknet, in 200 µl Wasser aufgenommen, 5 min bei 100°C denaturiert, und danach 5 ml Hybridisierungspuffer zugegeben.

Hybridisierungspuffer: 50% Formamid
2 x SSC
4 mM EDTA
1 % SDS
0.12 M KCl pH 6.8
4 x Denhardts
(1 x Denhardts = 0.02 % Ficoll, 0.02 % Polyvinylpyrrolidone, 0.02 % BSA)

4.5. Hybridisierung

Die gebackenen Nitrocellulose- oder Genescreen-Filter werden in eine Plastiktüte gelegt und mit Hybridisierungspuffer getränkt. Danach wird die nicktranslatierte Probe zugegeben und die Tüte zugeschweißt. Die Hybridisierung erfolgt über Nacht bei 42°C.

4.6. Waschen der hybridisierten Filter

Nach Beendigung der Hybridisierung wird die Probe entfernt und bei -20°C aufbewahrt. Die Filter werden kurz in 2 x SSC bei Raumtemperatur abgespült, dann 1 hr in 0.1 x SSC, 1 % SDS bei 60°C gewaschen. Die Lösung wird nach 30 min einmal gewechselt. Bei starken backgroundproblemen wurde 1 hr in 2 x SSC, 8 % SDS bei 60°C gewaschen. Auch der Hybridisierungs-puffer, in dem die nicktranslatierte Probe gelöst ist, enthielt in diesem Fall 8 % SDS. Nach dem Waschen wurden die Filter luftgetrocknet und in Plastiktüten verpackt.

4.7. Autoradiographie

Die gewaschenen Filter werden in einer Kasette mit einem Röntgenfilm (Kodak Diagnostic Film XAR 5) und einem intensifying screen (Du Pont Cronex, Quanta III) bei -60°C exponiert. Entwickelt wird der Film mit D-19-Entwickler (Kodak).

5. Gewinnung der c-DNA-Klone

Discoidin I-, M3- und I42-cDNA-Klone, integriert in pBR-Plasmid, wurden mir von Dr. A. Noegel und Dr. W. Nellen (Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried) zur Verfügung gestellt. Um größere Mengen des Plasmids zu erhalten, transformierte ich Bakterien damit und isolierte anschließend das Plasmid. Bereits transformierte Bakterien erhielt ich außerdem von Dr. D. Blumberg (PL3-Klon) und von Dr. H. Lodish (D11-, D19- und EB4-Klon).

5.1. Transformation der Bakterien (nach Maniatis et al 1982)

Als Bakterienstamm wird M1061 (von W. Nellen) verwendet. Eine Einzelkolonie wird in 5 ml LB-Medium aufgenommen und über Nacht bei 37°C bebrütet. 2 ml dieser Übernachtskultur werden in 100 ml LB-Medium ausverdünnung und 90 min bei 37°C geschüttelt. Die Zellen müssen sich in der exponentiellen Wachstumsphase befinden und sollen eine Dichte von etwa 5×10^7 /ml erreicht haben. Die optische Dichte bei 550 nm kann als Kontrolle dienen. Anschließend werden die Zellen 10 min auf Eis gestellt, danach 5 min bei 400 rpm abzentrifugiert, die Pellets in der Hälfte des ursprünglichen Volumens in 10 mM Tris, 50 mM CaCl_2 -Puffer, pH 8, aufgenommen und 20 min auf Eis inkubiert. Die Zellen werden erneut pelletiert (4000 rpm, 5 min), in 1/10 Volumen Tris/ CaCl_2 -Puffer aufgenommen und über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Zellen erlangen auf diese Weise Kompetenz, d.h. sie werden befähigt, Nukleinsäuren durch ihre

Membran aufzunehmen. 200 µl kompetente Zellen und 10 - 20 ngr DNA werden 20 min auf Eis, dann 1 min bei 41°C inkubiert. 1 ml LB-Medium wird zugegeben und die Zellen 40 min bei 37°C, ohne zu schütteln, inkubiert. In dieser Zeit entwickeln sie die, durch das Plasmid vermittelte, Antibiotikaresistenz. Anschließend werden die Zellen auf LB-Platten mit 40 µl Tetracyclin/ml ausplattiert.

Das pBR-Plasmid selbst enthält 2 Gene, die Resistenzen gegen Ampicillin und Tetracyclin vermitteln. Alle drei cDNA-Klone (I42, M3, Discoidin I) wurden in die PST I-Stelle, die im Ampicillinresistenzgen liegt, hineinkloniert, so daß auf diese Weise die Ampicillinresistenz inaktiviert wird. Klone, die auf Tetracyclinplatten erscheinen, können zur Kontrolle auf Ampicillin-Platten überimpft werden, auf denen sie dann nicht wachsen dürfen.

LB-Medium:	Bactotrypton	10 gr
	Bacto-Hefeextrakt	5 gr
	NaCl	10 gr
	mit Wasser auf 1 l auffüllen, pH 7.5	

5.2. Plasmidisolation (nach Maniatis et al 1982)

Ein Klon der transformierten Bakterien wird in 400 ml LB-Medium (+ 40 µg/ml Tetracyclin) aufgenommen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Danach werden die Zellen abzentrifugiert (15 min, 5000 rpm), in 10 ml Lösung I resuspendiert und 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend wird 19 ml 0.2 M NaOH und 1 % SDS zugegeben und 10 min auf Eis inkubiert. Die Zellen werden dadurch lysiert, zur Unterstützung kann das Zentrifugenglas vorsichtig gedreht und gekippt werden. Nachdem die Zellen vollständig lysiert sind (dauert etwa 10 min), wird 12 ml 3 M Natriumacetat, pH 4.6, zugegeben und vorsichtig vermischt. Nach 20 minütiger Inkubation auf Eis werden die Zellfragmente abzentrifugiert (10.000 rpm, 15 min). Der Überstand wird mit RNase (Endkonzentration 20 µgr/ml) 20 min bei 37°C behandelt. Danach wird zweimal mit dem gleichen Volumen Phenol/Chloroform (1+1) extrahiert, und schließlich mit dem zweifachen Volumen an reinem Ethanol gefällt (60 min oder länger bei -20°C). Das Präzipitat wird dann abzentrifugiert (10.000 rpm, 15 min), in 6.5 ml Lösung II aufgenommen und 60 min auf Eis inkubiert. Danach wird erneut pelletiert (10.000 rpm, 15 min), das Pellet in 70 % Alkohol gewaschen, nochmal abzentrifugiert (10.000 rpm, 15 min) und in 100 - 500 µl sterilem Wasser resuspendiert. Um die Konzentration des Plasmids zu bestimmen, wird ein Aliquot entnommen, und die optische Dichte bei 260 und 280 nm bestimmt. Eine optische Dichte bei 260 nm von 1.0 entspricht 50 µgr DNA. Ist die DNA frei von Proteinen und anderen Kontaminationen, ist das Verhältnis $OD_{260}/OD_{280} = 1.8$.

Lösung I: 25 mM Tris, pH 7.4
 10 mM EDTA, pH 7.4
 15 % Saccharose
 2 mgr/ml Lysozym

Lösung II: 0.4 M NaCl
 6.5 % Polyethylenglykol (w/v, PEG 8000)

6. DNA-Analysen

6.1. Isolierung genomischer *Dictyostelium*-DNA

200 ml stationäre *Dictyostelium*-Zellen werden abzentrifugiert, einmal gewaschen, mit sterilem KK_2 -Puffer (50 mM, pH 6.2) auf $2-3 \times 10^7$ /ml konzentriert und 1-2 hr geschüttelt. In dieser Zeit werden die restlichen Bakterien verdaut. Die Zellen werden dann pelletiert und mit eiskalter HMN-Lösung auf 2×10^8 /ml konzentriert. Das dafür benötigte Volumen an HMN wird notiert (Volumen = a ml). NP-40 wird zugegeben (Endkonzentration 0.5 % NP-40) und 5 min auf Eis geschüttelt und gevortext. Die Lyse der Zellen wird mikroskopisch kontrolliert. Ist ein Großteil der Zellen lysiert, wird 10 min bei 10.000 rpm zentrifugiert. Das Pellet (= Zellkerne) wird in 0.5 x a ml kaltem HMN und 0.5 % NP-40 resuspendiert, 5 min auf Eis geschüttelt und 10 min bei 10.000 rpm abzentrifugiert. Das Pellet wird in 0.4 x a ml kaltem HMN resuspendiert, und 0.5 x a ml 0.1 M EDTA / 2% Sarkosyl-Lösung zugegeben. Durch vorsichtiges Drehen und Kippen werden die Kerne lysiert. Anschließend wird eine Spatelspitze Proteinase K zugegeben und 30 min bei 65°C und danach 60 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wird das zweifache Volumen Ethanol (Ethanol zur Synthese, Merck 818760) vorsichtig darübergeschichtet. Die DNA fällt nun als schleimiger Faden aus und kann mit einem sterilen Glasstab aufgewickelt werden. Die DNA wird kurz in 70 %igem Alkohol gewaschen und dann in sterilem Wasser aufgenommen. Um die restlichen Proteine zu entfernen, wird noch zweimal mit Phenol/Chloroform extrahiert.

HMN-Lösung: 0.01 M Magnesium acetat
 0.01 M NaCl
 0.03 M Hepes
 10 % Saccharose

6.2. Restriktionsverdau

Die Enzyme Eco RI wurden von Boehringer, Hind III von Takara/Japan bezogen. 0.5 - 2 µgr DNA werden im entsprechenden Schneidepuffer mit 2.3 mM Spermidin (Boehringer) und dem Restriktionsenzym 60 min bei 37°C inkubiert. Danach wird die Reaktion mit 10 mM EDTA

(pH 7.5) gestoppt, Gelladepuffer (0.25 % Bromphenolblau, 25 % Ficoll) dazugegeben, und die ganze Mischung auf ein 0.9 %iges Agarosegel aufgetragen.

Eco RI-Puffer: 100 mM Tris-HCl, pH 7.5
 50 mM NaCl
 10 mM MgCl₂

Hind III-Puffer: 10 mM Tris-HCl, pH 7.5
 50 mM NaCl
 10 mM MgCl₂
 1 mM DTT

6.3. DNA-Gelelektrophorese

Geschnittene genomische DNA wird auf 0.9 %igen Agarosegelen in TPE-Puffer bei 40 Volt aufgetrennt.

Sowohl das Gel als auch der Lauffuffer, (TPE-Puffer) enthielten Ethidiumbromid in einer Konzentration von 0.5 µg/ml.

TPE-Puffer: 80 mM Tris-phosphat
 8 mM EDTA, pH 8.0

6.4. Southern transfer

Nach Beendigung der Gelelektrophorese wird das Gel 60 min lang in 0.5 M NaOH/1.5 M NaCl denaturiert. Die Lösung wird nach 30 min einmal gewechselt. Anschließend wird 60 min in Neutralisationslösung inkubiert (1 M Tris-HCl, pH 8.0/1.5 M NaCl), und ebenfalls nach 30 min die Lösung erneuert. Der folgende Transfer der denaturierten DNA auf Trägermembranen, wie Nitrocellulose oder Genescreen, wird, wie beim Northern-transfer beschrieben, durchgeführt. Erfolgt der Transfer auf Genescreen, entfällt ein Backen bei 80°C nach Beendigung des Transfers.

7. Proteinanalysen

7.1. Aufbereitung der Zellproben für Protein-Gelelektrophorese

Zellproben werden pelletiert, das Pellet in Lämmli-Puffer (2 mgr/ml) aufgenommen, 3 min bei 100°C denaturiert und anschließend bei -80°C eingefroren.

Zuvor wurde von entsprechenden Aliquots ein Proteinassay nach Lowry et al (1951) durchgeführt.

Lämmli-puffer:

0.3 gr	DTT
1.0 gr	Saccharose
0.5 gr	SDS
2 ml	0.5 M Tris, pH 6.8
1.0 mgr	Bromphenolblau
mit Wasser auf 10 ml auffüllen	

7.2. Proteingelelektrophorese

Die Auftrennung der Proteine durch Gelelektrophorese erfolgt im wesentlichen nach Lämmli (1970).

Das running gel (10 % Polyacrylamid) wird zwischen zwei Glasplatten gegossen. Nachdem das Gel polymerisiert ist, wird eine Lösung aus 3 Teilen Wasser und 1 Teil 1.5 M Tris, pH 8.8 über das Gel geschichtet, mit Klarsichtfolie umwickelt und über Nacht stehengelassen. Am nächsten Morgen wird die Pufferlösung abgegossen und durch das stacking gel (3 % Polyacrylamid) ersetzt.

Je 10 μ l (= 20 μ g Protein) der aufgetauten Zellproben werden auf das Gel aufgetragen, und die Elektrophorese bei 200 Volt durchgeführt bis der Bromphenolblau-marker das Gelende erreicht hat.

Acrylamidstammlösung:

30 % Acrylamid
8 % N.N'-bis-methylenacrylamid

running gel:

Acrylamidstammlösung	13 ml
Wasser	17 ml
1.5 M Tris, pH 8.8	10 ml
10 % SDS	0.4 ml
10 % Ammoniumperphosphat	75 μ l
TEMED	25 μ l

stacking gel:

Acrylamidstammlösung	3 ml
Wasser	12 ml
0.5 M Tris, pH 6.8	5 ml
10 % SDS	0.2 ml
10 % Ammoniumperphosphat	75 μ l
TEMED	20 μ l

Laufpuffer:

0.025 M Tris, pH 8.3
0.192 M Glycin
0.1 % SDS

7.3. Westernblotting

Der Transfer der Proteine aus dem Polyacrylamidgel auf den Nitrocellulosefilter erfolgt elektrophoretisch bei 120 mA. (Towbin et al 1979).

Transfer-Puffer: 20 mM Tris
 150 mM Glycin
 20 % Methanol

8. Bestimmung der MUD1-Expression

Zellen werden durch Zugabe von Formaldehyd, pH 7.0, (Endkonzentration 4 %) fixiert und können in diesem Zustand über längere Zeit bei 4°C aufbewahrt werden. Zur Durchführung des Antigentests wird ein Aliquot Zellen auf Objektträger getropft, das gleiche Volumen monoklonaler MUD1-Antikörper (unverdünnter Überstand) zugegeben und 1 hr in einer feuchten Kammer inkubiert. Anschließend wird der Antikörper durch kurzes Eintauchen in dest. H₂O abgespült, und FITC-gekoppeltes Ziegen-anti-Maus-IgG (Miles-Yeda LTD), 1:40 verdünnt in KK₂ (50 mM, pH 6.2), zugegeben. Dieser wird ebenfalls 1 hr inkubiert und danach auf die gleiche Weise abgewaschen. Zuletzt wird ein Tropfen Tris/Glycerinlösung (2 Teile 50 mM Tris, pH 7.0, 1 Teil 87 % iges Glycerin) zugegeben, ein Deckglas aufgelegt und das Präparat unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet.

9. Durchführung der Geninduktions- und Genstabilisierungs-experimente

Für die Induktionsexperimente wurden aggregations-kompetente oder aggregierende Zellen in 50 mM KK₂ (pH 6.2) mehrmals gewaschen und anschließend in MES/PDF-Puffer in einer Konzentration von 5 - 10 x 10⁶ Zellen/ml resuspendiert. Je nach Versuchsbedingungen enthielt diese Lösung noch 1 mM EDTA.

Für die Stabilisierungsexperimente wurden Slugs mit einem Pinsel von der Agaroberfläche abgeschabt und in 50 mM KK₂ (pH 6.2) gesammelt. Danach wurden sie durch ein Nylontuch filtriert und mehrmals mit KK₂ nachgespült. Mitabgeschabte, nichtaggregierte Einzelzellen werden somit gewegewaschen, die Slugs selbst bleiben auf dem Nylontuch. Die gewaschenen Slugs wurden dann in eine Cellulaselösung überführt und 5 min unter ständigem Pipettieren in Einzelzellen zerlegt. Anschließend wird die Cellulaselösung gewegewaschen, und die disaggregierten Slugzellen werden in einer Konzentration von 5-10 x 10⁶ Zellen/ml in MES/PDF-Puffer resuspendiert. Je nach Versuchsbedingungen enthielt diese Lösung noch 10 mM EDTA.

Von den in MES/PDF suspendierten Zellen wurden je 10 ml auf 50 ml-Erlenmeyerkolben verteilt, und 2'-O-Dibutyryl-cAMP (500 μ M) und cAMP (0.2 - 100 μ M) zugegeben. Kontrollversuche umfaßten einen Kolben, dem weder Dibutyryl-cAMP noch cAMP beigegeben wurde, und einen Kolben, der nur Dibutyryl-cAMP, jedoch kein cAMP enthielt. Die Kolben wurden dann bei Raumtemperatur geschüttelt. Die Dauer und Schnelligkeit des Schüttelns richtete sich nach den jeweiligen Versuchsbedingungen. (siehe Legende der einzelnen Figuren). Nach Beendigung des Experiments wurden die Zellen pelletiert und bei -80°C eingefroren. Das Zellpellet diente dann der RNA-Isolierung. Teilweise wurden außerdem Zellproben entnommen und formaldehydfixiert. Diese dienten dem Nachweis der MUD1-Expression.

MES/PDF-Lösung:	20 mM KCl
	1.2 mM MgSO ₄
	7.5 mM MES, pH 6.5
Cellulaselösung	150 mM NaCl
	2 mM EDTA
	20 mM KK ₂ , pH 5.8
	10 mgr/ml Cellulase (Serva Nr. 16419)

Literaturverzeichnis.

Alexander, S., Shinnick, T. M., and Lerner, R. A. (1983). Cell 34, 467-475. Mutants of *Dictyostelium discoideum* blocked in expression of all members of the developmentally regulated discoidin multigene family

Alexander, S., and Shinnick, T. M. (1985). Mol. and cell. Biol. 5, 984-990. Specific regulation of transcription of the discoidin gene family in *Dictyostelium discoideum*

Alexander, S., Cibulsky, A., and Cuneo, S. D. (1986). Mol. and cell. Biol. 6, 4353-4361. Multiple regulatory genes control expression of a gene family during development of *Dictyostelium discoideum*

Alton, T. H., and Lodish, H. F. (1977). Dev Biol. 60, 207-216. Synthesis of developmentally regulated proteins in *Dictyostelium discoideum* which are dependent on continued cell-cell-interactions

Armant, D. R., Stetler, D. A., and Rutherford, C. L. (1980). J. Cell Sci. 45, 119-129. Cell surface localization of 5'AMP nucleotidase in prestalk cells of *Dictyostelium discoideum*

Barclay, S. L., and Henderson, E. J. (1986). Diff. 33, 111-120. Altered cyclic-AMP receptor activity and morphogenesis in a chemosensory mutant of *Dictyostelium discoideum*

Barklis, E., and Lodish, H. F. (1983). Cell 32, 1139-1148. Regulation of *Dictyostelium discoideum* mRNAs specific for prespore or prestalk cells

Barondes, S. H., Haywood-Ried, P. L., and Cooper, D. N. W. (1985). J. Cell Biol. 100, 1825-1833. Discoidin I, an endogenous lectin, is externalized from *Dictyostelium discoideum* in multilamellar bodies

Bartles, J. R., Frazier, W. A., and Rosen, S. D. (1982). Int. Rev. Cytol., Vol. 75, pp. 61-99. (Bourne, G. H., and Danielli, J. F., eds., New York Academic Press). Slime mold lectins

Berger, E. A., and Clark, J. M. (1983). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 4983-4987. Specific cell-cell contact serves as the developmental signal to deactivate discoidin I gene expression in *Dictyostelium discoideum*

Berger, E. A., Bozzone, D. M., Berman, M. B., Morgenthaler, J. A., and Clark, J. M. (1985). J. cell. Biochem. 27, 391-400. Regulation of Discoidin I gene expression in *Dictyostelium discoideum* by cell-cell contact and cAMP

Blaschke, A., Weijer, C. J., and MacWilliams, H. K. (1986). Diff. 32, 1-9. *Dictyostelium discoideum*: Cell-type proportioning, cell differentiation preference, cell fate, and the behavior of anterior-like cells in Hs1/Hs2 and G+/G-mixtures.

- Blumberg, D. D., Margolskee, J. P., Barklis, E., Chung, S. N., Cohen, N. S., and Lodish, H. F. (1982). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 127-131. Specific cell-cell contacts are essential for induction of gene expression during differentiation of *Dictyostelium discoideum*
- Bonner, J. T. (1949). *J. Exp. Zool.* 110, 259-271. The demonstration of acrasin in the later stages of the development of the slime mold *Dictyostelium discoideum*
- Bonner, J. T. (1957). *Quart. Rev. Biol.* 32, 232-246. A theory of the control of differentiation in the cellular slime molds
- Bozzzone, D. M., and Berger, E. A. (1987). *Diff.* 33, 197-206. Distinct developmental regulation and properties of the responsiveness of different genes to cyclic AMP in *Dictyostelium discoideum*
- Brenner, M. (1977). *J. Biol. Chem.* 252, 4073-4077. Cyclic AMP gradient in migrating pseudoplasmodia of the cellular slime mold *Dictyostelium discoideum*
- Brenner, M. (1978). *Dev. Biol.* 64, 210-223. Cyclic AMP levels and turnover during development of the cellular slime mold *Dictyostelium discoideum*
- Brenner, M., and Thoms, S. D. (1984). *Dev. Biol.* 101, 136-146. Caffeine blocks activation of cyclic AMP synthesis in *Dictyostelium discoideum*
- Brookman, J. J., Town, C. D., Jermyn, K. A., and Kay, R. R. (1982). *Dev. Biol.* 91, 191-196. Developmental regulation of a stalk cell differentiation-inducing factor in *Dictyostelium discoideum*
- Brookman, J. J., Jermyn, K. A., and Kay, R. R. (1987). *Development* 100, 119-124. Nature and distribution of the morphogen DIF in the *Dictyostelium* slug
- Brown, S. S., and Rutherford, C. L. (1980). *Diff.* 16, 173-183. Localization of cyclic nucleotide Phosphodiesterase in the multicellular stages of *Dictyostelium discoideum*
- Cardelli, J. A., Knecht, D. A., Wunderlich, R., and Dimond, R. L. (1985). *Dev. Biol.* 110, 147-156. Major changes in gene expression occur during at least four stages of development of *Dictyostelium discoideum*
- Chang, Y. Y. (1968). *Science* 161, 57-69. Cyclic 3'5'-AMP diesterase produced by the slime mold *Dictyostelium discoideum*
- Chassy, B. M. (1972). *Science* 175, 1016-1018. Cyclic nucleotide Phosphodiesterase in *Dictyostelium discoideum*: Interconversion of two enzyme forms
- Chisholm, R. L., Barklis, E., and Lodish, H. F. (1984). *Nature (London)* 310, 67-69. Mechanism of sequential

induction of cell-type specific mRNAs in *Dictyostelium* differentiation

Chung, S., Landfear, S. M., Blumberg, D. D., Cohen, N. S., and Lodish, H. F. (1981). Cell 24, 785-797. Synthesis and stability of developmentally regulated *Dictyostelium* mRNAs are affected by cell-cell contact and cAMP

Darmon, M., and Klein, C. (1978). Dev. Biol. 63, 377-389. Effects of amino acids and glucose on adenylate cyclase and cell differentiation of *Dictyostelium discoideum*

Datta, S., Mann, S. K. O., Hjorth, A., Gomer, R., Howard, P., Armstrong, D., Reymond, C., Silan, C., and Firtel, R. A. (1987). In: 45th Symposium of the Society for Developmental Biology. Genetic Regulation of Development. Loomis, W. F. (ed.), Alan R. Liss, Inc., New York. pp 33-61. cAMP-regulated gene expression during *Dictyostelium* development is mediated by the cell-surface cAMP receptor

De Gunzburg, J., and Veron, M. (1982). EMBO J. 1, 1063-1068. A cAMP-dependent protein kinase is present in differentiating *Dictyostelium discoideum* cells

Devine, J. M., Tsang, A. S., and Williams, J. G. (1982). Cell 28, 793-800. Differential expression of the members of the discoidin I multigene family during growth and development of *Dictyostelium discoideum*

Devine, J. M., and Loomis, W. F. (1985). Dev. Biol. 107, 364-372. Molecular characterization of anterior-like cells in *Dictyostelium discoideum*.

Devreotes, P. N., and Steck, T. L. (1979). J. Cell. Biol. 80, 300-309. Cyclic AMP relay in *Dictyostelium discoideum*. Part 2. Requirements for the initiation and termination of the response

Dinauer, M., MacKay, S., and Devreotes, P. N. (1980a). J. Cell Biol. 86, 537-544. Cyclic 3'5'-AMP Relay in *Dictyostelium discoideum*. III. The relationship of cAMP synthesis and secretion during the cAMP signaling response

Dinauer, M., Steck, T. L., and Devreotes, P. N. (1980b). J. Cell Biol. 86, 545-553. Cyclic 3'5'-AMP Relay in *Dictyostelium discoideum*. IV. Recovery of the cAMP signaling response after adaptation to cAMP

Dinauer, M., Steck, T. L., and Devreotes, P. N. (1980c). J. Cell Biol. 86, 554-561. Cyclic 3'5'-AMP Relay in *Dictyostelium discoideum*. V. Adaptation of the cAMP signaling response during cAMP stimulation

Finney, R., Varnum, B., and Soll, D. R. (1979). Dev. Biol. 73, 290-303. "Erasure" in *Dictyostelium*: A dedifferentiation involving the programmed loss of chemotactic functions

Finney, R., Slutsky, B., and Soll, D. R. (1981). Dev. Biol. 84, 313-321. Cyclic AMP inhibits dedifferentiation in the cellular slime mold *Dictyostelium discoideum*

- Firtel, R. A., Cockburn, A., Frankel, G., and Hershfield, V. (1976). *J. Mol. Biol.* 102, 831-852. Structural organization of the genome of *Dictyostelium discoideum*: Analysis by EcoRI Restriction Endonuclease
- Forman, D., and Garrod, D. R. (1977). *J. Embryol. Exp. Morphol.* 40, 215-228. Pattern formation in *Dictyostelium discoideum*. 1. Development of prespore cells and its relationship to the pattern of the fruiting body
- Frame, L. T., and Rutherford, C. L. (1984). *Arch. Biochem. Biophys.* 232, 47-57. Endogenous substrates for *in vitro* phosphorylation by cAMP-dependent protein kinase
- Franke, J., and Kessin, R. H. (1981). *J. Biol. Chem.* 256, 7628-7637. The cyclic nucleotide phosphodiesterase inhibitory protein of *Dictyostelium discoideum*. Purification and characterization
- Frazier, W. A., Rosen, S. D., Reitherman, R. W., and Barondes, S. H. (1975). *J. Biol. Chem.* 250, 7714-7721. Purification and comparison of two developmentally regulated lectins from *Dictyostelium discoideum*
- Gabius, H.-J., Springer W. R., and Barondes, S. H. (1985). *Cell*, 42, 449-456. Receptor for the cell binding site of Discoidin I
- Garrod, D. R., and Ashworth, J. M. (1972). *J. Embryol. Exp. Morphol.* 28, 463-479. Effect of growth conditions on development of the cellular slime mould *Dictyostelium discoideum*
- Garrod, D. R., and Ashworth, J. M. (1973). *Symp. Soc. Gen. Microbiol.* 23, 407-435. Development of the cellular slime mould *Dictyostelium discoideum*
- Garrod, D. R., and Malkinson, A. M. (1973). *Exp. Cell Res.* 81, 492-495. Cyclic AMP, pattern formation and movement in the slime mould *Dictyostelium discoideum*
- Garrod, D. R., and Forman, D. (1977). *Nature* 265, 144-146. Pattern formation in the absence of polarity in *Dictyostelium discoideum*
- Gerisch, G., and Hess, B. (1974). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71, 2118-2122. Cyclic AMP-controlled oscillations in suspended *Dictyostelium* cells: their relation to morphogenetic cell interactions
- Gerisch, G., Fromm, H., Huesgen, A., and Wick, U. (1975). *Nature (London)* 255, 547-549. Control of cell contact sites by cAMP pulses in differentiating *Dictyostelium discoideum* cells
- Gomer, R. H., Armstrong, D., Leichtling, B. H., and Firtel, R. A. (1986a). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 8624-8628. cAMP induction of prespore and prestalk gene expression in *Dictyostelium* is mediated by the cell-surface cAMP receptor

Gomer, R. H., Datta, S., and Firtel, R. A. (1986b). J. Cell Biol. 103, 1999-2015. Cellular and subcellular distribution of a cAMP regulated prestalk protein and prespore protein in *Dictyostelium discoideum*: a study on the ontogeny of prestalk and prespore cells

Green, A. A., and Newell, P. C. (1975). Cell 6, 129-136. Evidence for the existence of two types of cAMP binding sites in aggregating cells of *Dictyostelium discoideum*

Gregg, J. H., Krefft, M., Haas-Kraus, A., and Williams, K. L. (1982). Exp. Cell Res. 142, 229-233. Antigenic differences detected between prespore cells of *Dictyostelium discoideum* and *Dictyostelium mucoroides* using monoclonal antibodies

Gross, J. D., Bradbury, J., Kay, R. R., and Peacey, M. J. (1983). Nature (London) 303, 244-245. Intracellular pH and the control of cell differentiation in *Dictyostelium discoideum*

Haribabu, B., and Dottin, R. P. (1986). Mol. and cell. Biol. 6, 2402-2408. Pharmacological characterization of cyclic AMP receptors mediating gene regulation in *Dictyostelium discoideum*

Henderson, E. J. (1975). J. Biol. Chem. 250, 4730-4736. The cyclic Adenosine 3':5'-monophosphate receptor of *Dictyostelium discoideum*

Hofstee, B. H. J. (1952). Science 116, 329-331. On the evaluation of the constants v_m and K_m in enzyme reactions.

Inouye, K., and Takeuchi, I. (1982). Exp. Cell Res. 138, 311-318. Correlations between prestalk-prespore tendencies and cAMP-related activities in *Dictyostelium discoideum*

Juliani, M. H., Brusca, J., and Klein, C. (1981). Dev. Biol. 83, 114-121. cAMP regulation of cell differentiation in *Dictyostelium discoideum* and the role of the cAMP receptor

Kay, R. R., Town, C. D., and Gross, J. D. (1979). Diff. 13, 7-14. Cell differentiation in *Dictyostelium discoideum*

Kay, R. R., and Trevan, D. J. (1981). J. Embryol. and exp. morphol. 62, 369-378. *Dictyostelium amoebae* can differentiate into spores without cell-to-cell contact

Kay, R. R. (1982). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 3228-3231. cAMP and spore differentiation in *Dictyostelium discoideum*

Kay, R. R., and Jermyn, K. A. (1983). Nature (London) 303, 242-244. A possible morphogen controlling differentiation in *Dictyostelium*

Kay, R. R., Gadian, D. G., and Williams, S. R. (1986). J. Cell Sci. 83, 165-179. A ^{31}P nuclear magnetic resonance study of its regulation and possible role in controlling cell differentiation

- Kesbeke, F., and van Haastert, P. J. M. (1985). *Biochim. Biophys. Acta* 847, 33-39. Selective down-regulation of cell surface cAMP-binding sites and cAMP-induced responses in *Dictyostelium discoideum*
- Kesbeke, F., van Haastert, P. J. M., and Schaap, P. (1986). *FEMS Microbiol. Lett.* 34, 85-89. Cyclic AMP relay and cyclic AMP-induced cyclic GMP accumulation during development of *Dictyostelium discoideum*
- Kimmel, A. R., and Carlisle, B. (1986). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83, 2506-2510. A gene expressed in undifferentiated vegetative *Dictyostelium* is repressed by developmental pulses of cAMP and reinduced during differentiation
- Klein, C., and Darmon, M. (1975). *Biochem. Biophys. res. commun.* 67, 440-447. The relationship of Phosphodiesterase to the developmental cycle of *Dictyostelium discoideum*
- Klein, C., and Darmon, M. (1977). *Nature (London)* 268, 76-78. Effects of cyclic AMP pulses on adenylate cyclase and the phosphodiesterase inhibitor of *Dictyostelium discoideum*
- Klein, C., and Juliani, M. H. (1977). *Cell* 10, 329-335. cAMP-induced changes in cAMP binding sites on *Dictyostelium discoideum* amebae
- Klein, P., Fontana, D., Knox, B., Theibert, A., and Devreotes, P. (1985). Cold Spring Harbor Symposia on quantitative biology, Vol. 50, pp 787-799. Cyclic AMP receptors controlling cell-cell interactions in the development of *Dictyostelium*
- Konijn, T. M., Van de Meene, J. G. C., Bonner, J. T., and Barclay, D. S. (1967). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 58, 1152-1154. The acrasin activity of adenosine-3',5'-cyclic phosphate.
- Kopachik, W., Oohata, A., Dhokia, B., Brookman, J. J., and Kay, R. R. (1983). *Cell* 33, 397-403. *Dictyostelium* mutants lacking DIF, a putative morphogen
- Krefft, M., Voet, L., Gregg, J. H., and Williams, K. L. (1985). *J. Embryol. Exp. Morphol.* 88, 15-24. Use of a monoclonal antibody recognizing a cell surface determinant to distinguish prestalk and prespore cells of *Dictyostelium discoideum* slugs
- Kumagai, A., and Okamoto, K. (1986). *Diff.* 31, 79-84. Prespore-inducing factors in *Dictyostelium discoideum*. Developmental regulation and partial purification
- Laemmli, U. K. (1970). *Nature* 227, 680-685. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4
- Landfear, S. M., and Lodish, H. F. (1980). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 1044-1048. A role for cyclic AMP in expression of developmentally regulated genes of *Dictyostelium discoideum*

Leach, C. K., Ashworth, J. M., and Garrod, D. R. (1973). *J. Embryol. Exp. Morphol.* 29, 647-661. Cell sorting out during the differentiation of mixtures of metabolically distinct populations of *Dictyostelium discoideum*

Leichtling, B. H., Majerfeld, I. H., Spitz, E., Schaller, K. L., Woffendin, C., Kakinuma, S., and Rickenberg, H. V. (1984). *J. Biol. Chem.* 259, 662-668. A cytosolic cyclic AMP-dependent protein kinase in *Dictyostelium discoideum*. II. Developmental regulation

Loomis, W. F. (1970). *J. of Bacteriol.* 103, 375-381. Developmental regulation of α -Mannosidase in *Dictyostelium discoideum*

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. (1951). *J. Biol. Chem.* 193, 265-275. Protein measurements with the folin phenol reagent

MacWilliams, H. K., and Bonner, J. T. (1979). *Diff.* 14, 1-22. The prestalk-prespore pattern in cellular slime molds.

MacWilliams, H. K. (1982). *Developmental Order: Its origin and regulation*. New York: Alan R. Liss. pp. 463-483. Transplantation experiments and pattern mutants in cellular slime mold slugs.

MacWilliams, H. K., and David, C. N. (1984). Cold Spring Harbour Symposium on microbial development. (Shapiro, L. and Losick, R. eds.) pp. 255-274. Pattern formation in *Dictyostelium*.

MacWilliams, H. K., Blaschke, A., and Prause, I. (1985). Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology 50, 770-785. Two feedback loops may regulate cell-type proportions in *Dictyostelium*.

Majerfeld, I. H., Leichtling, B. H., Meligeni, J. A., Spitz, E., and Rickenberg, H. V. (1984). *J. Biol. Chem.* 259, 654-661. A cytosolic cyclic AMP-dependent protein kinase in *Dictyostelium discoideum*. I. Properties

Malchow, D., Nägele, B., Schwarz, H., and Gerisch, G. (1972). *Eur. J. Biochem* 28, 136-142. Membrane-bound cyclic AMP phosphodiesterase in chemotactically responding cells of *Dictyostelium discoideum*

Malkinson, A. M., and Ashworth, J. M. (1973). *Biochem.J.* 134, 311-319. Adenosine 3':5'-cyclic monophosphate concentrations and Phosphodiesterase activities during axenic growth and differentiation of cells of the cellular slime mould *Dictyostelium discoideum*

Mangiarotti, G., Lefebvre, P., and Lodish, H. F. (1982). *Dev. Biol.* 89, 82-91. Differences in the stability of developmentally regulated mRNAs in disaggregated *Dictyostelium discoideum* cells

- Mangiarotti, G., Ceccarelli, A., and Lodish, H. F. (1983). *Nature* (London) 301, 616-618. Cyclic AMP stabilizes a class of developmentally regulated *Dictyostelium discoideum* mRNAs
- Maniatis, T., Fritsch, E., and Sambrook, J. (1982). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.
- Mann, S. K. O., and Firtel, R. A. (1987). *Mol. and cell. Biol.* 7, 458-469. Cyclic AMP regulation of early gene expression in *Dictyostelium discoideum*: Mediation via the cell surface cyclic AMP receptor
- Margolskee, J. P., and Lodish, H. F. (1980). *Dev. Biol.* 74, 37-49. Half-lives of messenger RNA species during growth and differentiation of *Dictyostelium discoideum*
- Mato, J. M., Krens, F. A., van Haastert, P. J. M., and Konijn, T. M. (1977). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 2348-2351. 3':5'-cyclic AMP dependent 3':5' cyclic GMP accumulation in *Dictyostelium discoideum*
- Mehdy, M. C., Ratner, D., and Firtel, R. A. (1983). *Cell* 32, 763-771. Induction and Modulation of cell-type-specific gene expression in *Dictyostelium*
- Mehdy, M. C., and Firtel, R. A. (1985). *Mol. and cell. Biol.* 5, 705-713. A secreted factor and cyclic AMP jointly regulate cell-type specific gene expression in *Dictyostelium discoideum*
- Meinhardt, H. (1983). *Diff.* 24, 191-202. A model for the prestalk/prespore patterning in the slug of the slime mold *Dictyostelium discoideum*.
- Merkle, R. K., and Rutherford, C. L. (1984). *Diff.* 26, 23-29. Localization of adenylate cyclase during development of *Dictyostelium discoideum*
- Merkle, R. K., Cooper, K. K., and Rutherford, C. L. (1984). *Cell Diff.* 14, 257-266. Localization and levels of cAMP during development of *Dictyostelium discoideum*
- Morris, H. R., Taylor, G. W., Masento, M. S., Jermyn, K. A., and Kay, R. R. (1987). *Nature* 328, 811-814. Chemical structure of the morphogen differentiation inducing factor from *Dictyostelium discoideum*
- Mullens, I. A., and Newell, P. C. (1978). *Diff.* 10, 171-176. cAMP-binding to cell surface receptors of *Dictyostelium*
- Newell, P. C., Ellingson, J. S., and Sussman, M. (1969). *Biochim. Biophys. Acta* 177, 610-614. Synchrony of enzyme accumulation in a population of differentiating slime mold cells
- Newell, P. C. (1982). *FEMS Microbiol. Lett.* 13, 417-421. Cell surface binding of adenosine to *Dictyostelium* and inhibition of pulsatile signalling

- Newell, P. C., and Ross, F. M. (1982a). J. Gen. Microbiol. 128, 1639-1652. Genetic analysis of the slug stage of *Dictyostelium discoideum*.
- Newell, P. C., and Ross, F. M. (1982b). J. Gen. Microbiol. 128, 2715-2724. Inhibition by adenosine of aggregation centre initiation and cyclic AMP binding in *Dictyostelium*
- Okamoto, K. (1979). Eur. J. Biochem. 93, 221-227. Induction of cyclic AMP Phosphodiesterase by disaggregation of the multicellular complexes of *Dictyostelium discoideum*
- Oohata, A. A. (1983). J. Embryol. Exp. Morphol. 74, 311-319. A prestalk-cell-specific acid phosphatase in *Dictyostelium discoideum*
- Oohata, A. A. (1986). Cell Diff. 19, 271-279. Multiple forms of acid phosphatase and their differential secretion during stalk formation under submerged monolayer incubation of *Dictyostelium discoideum*
- Otte, A. P., Plomp, M. J. E., Arents, J. C., Janssens, P. M. W., and van Driel, R. (1986). Diff. 32, 185-191. Production and turnover of cAMP signals by prestalk and prespore cells in *Dictyostelium discoideum* cell aggregates
- Oyama, M., and Blumberg, D. D. (1986a). Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, 4819-4823. Interaction of cAMP with the cell-surface receptor induces cell-type-specific mRNA accumulation in *Dictyostelium discoideum*
- Oyama, M., and Blumberg, D. D. (1986b). Dev. Biol. 117, 550-556. Changes during differentiation in requirements for cAMP for expression of cell-type-specific mRNAs in the cellular slime mold *Dictyostelium discoideum*
- Oyama, M., and Blumberg, D. D. (1986c). Dev. Biol. 117, 557-566. cAMP and $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ both regulate cell-type-specific mRNA accumulation in the cellular slime mold *Dictyostelium discoideum*
- Pahlic, M., and Rutherford, C. L. (1979). J. Biol. Chem. 254, 9703-9707. Adenylate cyclase activity and cyclic AMP levels during the development of *Dictyostelium discoideum*
- Pan, P., Bonner, J. T., Wedner, H. T., Parker, C. W. (1974). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71, 1623-1625. Immunofluorescence evidence for the distribution of cyclic AMP in cells and cell masses of the cellular slime molds
- Pierschbacher, M. D., and Ruoslahti, E. (1984). Nature 309, 30-33. Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule
- Poole, S., Firtel, R. A., Lamar, E., and Rowekamp, W. (1981). J. Mol. Biol. 153, 273-289. Sequence and expression of the discoidin I gene family in *Dictyostelium discoideum*
- Ray, J., Shinnick, T., and Lerner, R. (1979). Nature (London) 279, 215-221. A mutation altering the functions of

a carbohydrate binding protein blocks cell-cell cohesion in developing *Dictyostelium discoideum*

Reymond, C. D., Gomer, R. H., Mehdy, M. C., and Firtel, R. A. (1984). Cell 39, 141-148. Developmental regulation of a *Dictyostelium* gene encoding a protein homologous to mammalian ras protein

Rickenberg, H. V., Tihon, C., and Güzel, Ö. (1977). Development and Differentiation in the cellular slime moulds, pp. 173-187. Elsevier/North-Holland. Amsterdam. (Cappuccinelli, P., and Ashworth, J. M. eds). The effect of pulses of 3',5'cyclic adenosine monophosphate on enzyme formation in nonaggregated amoebae of *Dictyostelium discoideum*

Riedel, V., and Gerisch, G. (1971). Biochem. Biophys. Res. Commun. 42, 119-124. Regulation of extracellular cyclic-AMP-phosphodiesterase activity during development of *Dictyostelium discoideum*

Rigby, P. W. J., Dieckmann, M., Rhodes, C., and Berg, P. (1977). J. Mol. Biol. 113, 237-251. Labeling deoxy-ribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I

Roos, W., Nanjundiah, V., Malchow, D., and Gerisch, G. (1975). FEBS Lett. 53, 139-142. Amplification of cAMP signals in aggregating cells of *Dictyostelium discoideum*

Rosen, S. D., Kafka, J. A., Simpson, D. L., and Barondes, S. H. (1973). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70, 2554-2557. Developmentally regulated carbohydrate-binding protein in *Dictyostelium discoideum*

Ross, F. M., and Newell, P. C. (1981). J. Gen. Microbiol. 127, 339-350. Streamers: Chemotactic mutants of *Dictyostelium discoideum* with altered cGMP metabolism.

Rowekamp, W., and Firtel, R. A. (1980). Dev. Biol. 79, 409-418. Isolation of developmentally regulated genes from *Dictyostelium*

Rowekamp, W., Poole, S., and Firtel, R. A. (1980). Cell 20, 495-505. Analysis of the multigene family coding the developmentally regulated carbohydrate-binding protein discoidin I in *Dictyostelium discoideum*

Rutherford, C. L., Taylor, R. D., Frame, L. T., and Auck, R. L. (1982). Biochem. Biophys. Res. Comm. 108, 1210-1220. A cAMP dependent protein kinase in *Dictyostelium discoideum*

Rutherford, C. L., and Brown, S. S. (1983). Dev. Biol. 96, 296-303. Cell type specific inhibition of cAMP Phosphodiesterase activity during terminal differentiation in *Dictyostelium discoideum*

Salomon, Y., Londos, C., and Rodbell, M. (1974). Anal. Biochem. 58, 541-548. A highly sensitive adenylate cyclase assay

Scatchard, G. (1949). Ann. N. Y. Acad. Sci. 51, 660. The attractions of proteins for small molecules and ions

Schaap, P., and Spek, W. (1984). Diff. 27, 83-87. Cyclic AMP binding to the cell surface during development of *Dictyostelium discoideum*

Schaap, P., and van Driel, R. (1985). Exp. Cell Res. 159, 388-398. Induction of postaggregative differentiation in *Dictyostelium discoideum* by cAMP

Schaap, P. (1986). Diff. 33, 1-16. Regulation of size and pattern in the cellular slime molds

Schaap, P., and Wang, M. (1986). Cell 45, 137-144. Interactions between adenosine and oscillatory cAMP signaling regulate size and pattern in *Dictyostelium*

Schaap, P., van Lookeren Campagne, M. M., van Driel, R., Spek, W., van Haastert, P. J. M., and Pinas, J. (1986). Dev. Biol. 118, 52-63. Postaggregative differentiation induction by cyclic AMP in *Dictyostelium*: Intracellular transduction pathway and requirement for additional stimuli

Schaller, K. L., Leichtling, B. H., Majerfeld, I. H., Woffendin, C., Spitz, E., Kakinuma, S., and Rickenberg, H. V. (1984). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 2127-2131. Differential cellular distribution of cAMP-dependent protein kinase during development of *Dictyostelium discoideum*

Schoen, C., Arents, J. C., and van Driel, R. (1984). Biochim. Biophys. Acta 784, 1-8. Isolation and properties of cyclic AMP-dependent protein kinase from *Dictyostelium discoideum*

Shaffer, B. M. (1975). Nature (London) 255, 549-552. Secretion of cyclic AMP induced by cyclic AMP in the cellular slime mold *Dictyostelium discoideum*

Shinnick, T. M., and Lerner, R. A. (1980). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 4788-4792. The *cbpA* gene: role of the 26,000 dalton carbohydrate-binding protein in intercellular cohesion of developing *Dictyostelium discoideum* cells

Simpson, D. L., Rosen, S. D., and Barondes, S. H. (1974). Biochemistry 13, 3487-3493. Discoidin, a developmentally regulated carbohydrate-binding protein from *Dictyostelium discoideum*. Purification and characterization

Siu, C. H., Lerner, R. A., Ma, G., Firtel, R. A., and Loomis, W. F. (1976). J. Mol. Biol. 100, 157-178. Developmentally regulated proteins of the plasma membrane of *Dictyostelium discoideum*. The carbohydrate binding protein

Sobolewski, A., Neave, N., and Weeks, G. (1983). Diff. 25, 93-100. The induction of stalk cell differentiation in submerged monolayers of *Dictyostelium discoideum*

Soll, D. R., and Waddell, D. R. (1975). Dev. Biol. 47, 292-302. Morphogenesis in the slime mold *Dictyostelium*

discoideum. I. The accumulation and erasure of "morphogenetic information"

Southern, E. M. (1975). J. Mol. Biol. 98, 503-517. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis

Springer, W. R., and Barondes, S. H. (1980). J. Cell Biol. 87, 703-707. Cell adhesion molecules: detection with univalent second antibody

Springer, W. R., Cooper, D. N. W., and Barondes, S. H. (1984). Cell 39, 557-564. Discoidin I is implicated in cell-substratum attachment and ordered cell migration of *Dictyostelium discoideum* and resembles fibronectin.

Sternfeld, J. and David, C. N. (1979). J. Cell Sci. 38, 181-191. Ammonia plus another factor are necessary for differentiation in submerged clumps of *Dictyostelium*

Sternfeld, J., and David, C. N. (1981). Diff. 20, 10-21. Cell sorting during pattern formation in *Dictyostelium discoideum*

Sternfeld, J., and David, C. N. (1982). Dev. Biol. 93, 111-118. Fate and regulation of anterior-like cells in *Dictyostelium* slugs

Sussman, M. (1966). Meth. Cell Physiol. 2, 397-410. Biochemical and genetic methods in the study of cellular slime mold development

Sussman, M., and Schindler, J. (1978). Diff. 10, 1-5. A possible mechanism of morphogenetic regulation in *Dictyostelium discoideum*

Takemoto, S., Okamoto, K., and Takeuchi, I. (1978). Biochem. Biophys. Res. Commun. 80, 858-865. The effects of cAMP on disaggregation-induced changes in the activities of developmentally regulated enzymes in *Dictyostelium discoideum*

Takeuchi, I. (1963). Dev. Biol. 6, 1-26. Immunochemical and immunohistochemical studies on the development of the cellular slime mold *Dictyostelium mucoroides*

Takeuchi, I., Tasaka, M., Oyama, M., Yamamoto, A., and Amagi, A. (1982). In "Embryonic Development". Part B: Cellular Aspects, pp. 283-294. Alan R. Liss, Inc., 150 Fifth Avenue, N. Y., NY 10011. Pattern formation in the development of *Dictyostelium discoideum*

Tasaka, M., Noce, T., and Takeuchi, I. (1983). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 5340-5344. Prestalk and prespore differentiation in *Dictyostelium* as detected by cell type-specific monoclonal antibodies

Theibert, A., and Devreotes, P. N. (1984). Dev. Biol. 106, 166-173. Adenosine and its derivatives inhibit the cAMP signaling response in *Dictyostelium discoideum*

Thompson, W. J., Brooker, G., and Appleman, M. M. (1974). In: *Methods in Enzymology*, Vol 38, pp 205-212. Academic press N.Y., San Francisco, London. (Hardman, J. G., and O'Malley, B. W. (eds)). Assay of cyclic nucleotide phosphodiesterases with radioactive substrates

Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979). *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76, 4350-4354. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications

Town, C. D., Gross, J. D., and Kay, R. R. (1976). *Nature (London)* 262, 717-719. Cell differentiation without morphogenesis in *Dictyostelium discoideum*

Town, C. D., and Stanford, E. (1979). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 308-312. Oligosaccharide-containing factor that induces cell differentiation in *Dictyostelium discoideum*

Town, C. D. (1984). *Diff.* 27, 29-35. Differentiation of *Dictyostelium discoideum* in monolayer cultures and its modification by ionic conditions

Tsang, A. S., Devine, J. M., and Williams, J. G. (1981). *Dev. Biol.* 84, 212-217. The multiple subunits of discoidin I are encoded by different genes

Van Haastert, P. J. M., van der Meer, R. C., and Konijn, T. M. (1981). *J. Bacteriol.* 147, 170-175. Evidence that the rate of association of adenosine 3',5'-monophosphate to its chemotactic receptor induces phosphodiesterase activity in *Dictyostelium discoideum*

Van Haastert, P. J. M., van Lookeren Campagne, M. M., and Ross, F. M. (1982). *FEBS Lett.* 147, 149-152. Altered cGMP phosphodiesterase activity in chemotactic mutants of *Dictyostelium discoideum*

van Haastert, P. J. M. (1983). *J. Biol. Chem.* 258, 9643-9648. Binding of cAMP and adenosine derivatives to *Dictyostelium discoideum* cells: Relationship between binding, chemotactic, and antagonistic activities

Van Haastert, P. J. M., and Kien, E. (1983). *J. Biol. Chem.* 258, 9636-9642. Binding of cAMP derivatives to *Dictyostelium discoideum* cells: Activation mechanism of the cell surface cAMP receptor

Van Haastert, P. J. M., and van der Heijden, P. R. (1983). *J. Cell Biol.* 96, 347-353. Excitation, adaptation, and deadaptation of the cAMP-mediated cGMP response in *Dictyostelium discoideum*

Van Haastert, P. J. M. (1984). *J. Gen. Microbiol.* 130, 2559-2564. A method for studying cAMP-relay in *Dictyostelium discoideum*: the effect of temperature on cAMP-relay

Van Haastert, P. J. M., and De Wit, R. J. W. (1984). *J. Biol. Chem.* 259, 13321-13328. Demonstration of receptor heterogeneity and affinity modulation by nonequilibrium binding experiments

van Haastert, P. J. M. (1985a). Biochim. Biophys. Acta 845, 254-260. The modulation of cell surface receptors from *Dictyostelium discoideum* by ammonium sulfate

van Haastert, P. J. M. (1985b). Biochim. Biophys. Acta 846, 324-333. cAMP activates adenylate and guanylate cyclase of *Dictyostelium discoideum* cells by binding to different classes of cell-surface receptors. A study with extracellular Ca^{2+}

van Haastert, P. J. M., de Wit, R. J. W., Janssens, P. M. W., Kesbeke, F., and DeGoede, J. (1986). J. Bio. Chem. 261, 6904-6911. G-protein-mediated interconversions of cell-surface cAMP receptors and their involvement in excitation and desensitization of guanylate cyclase in *Dictyostelium discoideum*

van Lookeren Campagne, M. M., and Lowik, G. W. M. (1985). Biochim. Biophys. Acta, 846, 55-63. The developmental regulation of L-ornithine decarboxylase in *Dictyostelium discoideum* and its induction by cAMP

Vaughan, R. A., and Rutherford, C. L. (1987). Dev. Biol. 121, 359-367. Distribution of cAMP-dependent protein kinase during development of *Dictyostelium discoideum*

Voet, L., Krefft, M., Brüderlein, M., and Williams, K. L. (1985). J. Cell Sci. 75, 423-435. Flow cytometer study of anterior-like cells in *Dictyostelium discoideum*

Waddell, D. R., and Soll, D. R. (1977). Dev. Biol. 60, 83-92. A characterization of the erasure phenomenon in *Dictyostelium*

Wang, M., and Schaap, P. (1985). Diff. 30, 7-14. Correlations between tip dominance, prestalk/prespore pattern, and cAMP-relay efficiency in slugs of *Dictyostelium discoideum*

Wang, M., van Haastert, P. J. M., and Schaap, P. (1986). Diff. 33, 24-28. Multiple effects of differentiation-inducing factor on prespore differentiation and cyclic AMP signal transduction in *Dictyostelium*

Weijer, C. J., and Durston, A. Y. (1985). J. Embryol. Exp. Morph. 86, 19-37. Influence of cyclic AMP and hydrolysis products on cell type regulation in *Dictyostelium discoideum*

Wier, P. W. (1977). Diff. 9, 183-192. Cyclic AMP and cyclic AMP phosphodiesterase and the duration of the interphase in *Dictyostelium discoideum*

Wilkinson, D. G., Wilson, J., and Hames, B. D. (1985). Dev. Biol. 107, 38-46. Spore coat protein synthesis during development of *Dictyostelium discoideum* requires a low molecular weight inducer and continued multicellularity

Williams, J. G., Tsang, A. S., and Mahbubani, H. (1980). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 7171-7175. A change in the

rate of transcription of a eucaryotic gene in response to cAMP

Williams, K. L., Fisher, P. R., MacWilliams, H. K., and Bonner, J. T. (1981). *Diff.* 18, 61-63. Cell patterning in *Dictyostelium discoideum*

Wurster, B., Schubiger, K., Wick, U., und Gerisch, G. (1977). *FEBS Lett.* 76, 141-144. Cyclic GMP in *Dictyostelium discoideum*. Oscillations and pulses in response to folic acid and cAMP

Yeh, R. P., Chan, F. K., and Coukell, M. B. (1978). *Dev. Biol.* 66, 361-374. Independent regulation of the extracellular cyclic AMP phosphodiesterase-inhibitor system and membrane differentiation by exogenous cyclic AMP in *Dictyostelium discoideum*

Hiermit möchte ich mich sehr herzlich bei Prof. Harry MacWilliams für seine Betreuung, seine stete Diskussionsbereitschaft, und sein Verständnis in allen Lebenslagen bedanken.

Weiterhin bedanke ich mich bei Frau Dr. Angelika Nögel für die ausgezeichnete Einführung in die molekularbiologischen Arbeitsmethoden, und bei Dr. Pauline Schaap und Dr. Peter van Haastert für die freundliche Aufnahme in Leiden/Holland, wo ich mit deren Hilfe die relay experimente durchführte.

Ferner möchte ich allen Mitarbeitern der Abteilung danken, insbesondere Herrn Dr. Kees Weijer und Frau Ursula Hamker für ihre stete Hilfsbereitschaft.

Lebenslauf

Name: Angela Blaschke
Geboren: 9. November 1957 in München

Ausbildung:

1964 - 1968	Volksschule in München
1968 - 1970	Bert-Brecht-Gymnasium in München
1971 - 1977	Elsa-Brandström-Gymnasium in München
1977	Abitur
1977 - 1984	Studium der Biologie an der Technischen Universität in München
1983 - 1984	Diplomarbeit bei Prof. H. K. MacWilliams
1984 - 1987	Doktorarbeit bei Prof. H. K. MacWilliams an der Ludwig-Maximilians-Universität in München

